



PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 6 :

C12N 15/52, 15/53, 15/54, 15/55, 15/81,
1/19, C12P 25/00 // (C12N 1/19, C12R
1:865)

A2

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: **WO 95/26406**

(43) Internationales
Veröffentlichungsdatum:

5. Oktober 1995 (05.10.95)

(21) Internationales Aktenzeichen:

PCT/EP95/00958

(22) Internationales Anmeldedatum:

15. März 1995 (15.03.95)

(30) Prioritätsdaten:

P 44 10 382.4

25. März 1994 (25.03.94)

DE

P 44 20 785.9

15. Juni 1994 (15.06.94)

DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BASF AK-
TIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; D-67056 Ludwigshafen
(DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): REVUELTA DOVAL, Jose,
Luis [ES/ES]; Pza. La Parra, 4, E-37001 Salamanca (ES).
BUTRAGO SERNA, Maria, Jose [ES/ES]; Avenida de los
Cedros, 33, E-37004 Salamanca (ES). SANTOS GARCIA,
Maria, Angeles [ES/ES]; Versalles, 7, E-37009 Santa Marta
(ES).

(74) Gemeinsamer Vertreter: BASF AKTIENGESELLSCHAFT;
D-67056 Ludwigshafen (DE).

(81) Bestimmungsstaaten: CA, CN, JP, RU, US, europäisches
Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT,
LU, MC, NL, PT, SE).

Veröffentlicht

Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu
veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.

(54) Title: RIBOFLAVIN SYNTHESIS IN FUNGI

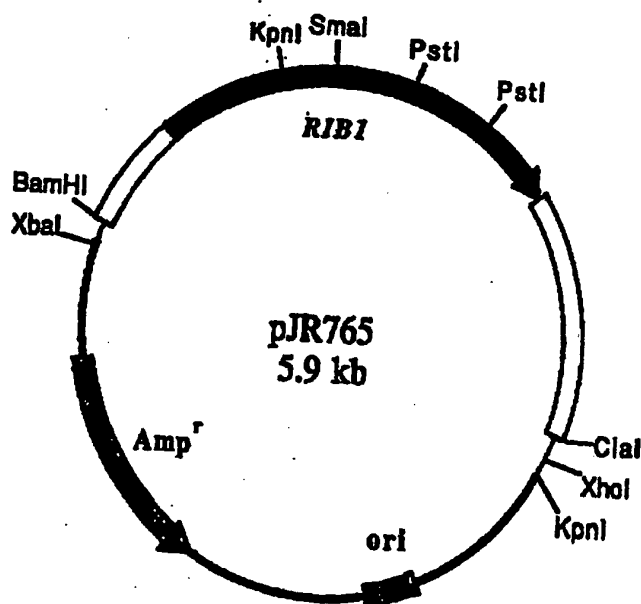
(54) Bezeichnung: RIBOFLAVIN-BIOSYNTHESE IN PILZEN

(57) Abstract

The invention concerns the
riboflavin-biosynthesis genes in the fungus
Ashbya gossypii as well as a method of
producing riboflavin using these genes and
gene products.

(57) Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft die
Gene für Riboflavin-Biosynthese in dem
Pilz Ashbya gossypii sowie gentechnische
Verfahren zur Herstellung von Riboflavin
unter Verwendung dieser Gene und Gen-
produkte.



LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	GA	Gabon	MR	Mauretanien
AU	Australien	GB	Vereinigtes Königreich	MW	Malawi
BB	Barbados	GE	Georgien	NE	Niger
BE	Belgien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BJ	Benin	IE	Irland	PL	Polen
BR	Brasilien	IT	Italien	PT	Portugal
BY	Belarus	JP	Japan	RO	Rumänien
CA	Kanada	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SI	Slowenien
CI	Côte d'Ivoire	KZ	Kasachstan	SK	Slowakei
CM	Kamerun	LI	Liechtenstein	SN	Senegal
CN	China	LK	Sri Lanka	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
ES	Spanien	MG	Madagaskar	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	ML	Mali	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MN	Mongolei	VN	Vietnam

Riboflavin-Biosynthese in Pilzen

Beschreibung

5

Die vorliegende Erfindung betrifft die Gene für Riboflavin-Biosynthese in Pilzen, die damit codierten Proteine sowie gentechnische Verfahren zur Herstellung von Riboflavin unter Verwendung dieser Gene und Genprodukte.

10

Die Herstellung von Riboflavin durch Fermentation von Pilzen wie *Eremothecium ashbyii* oder *Ashbya gossypii* ist bekannt (The Merck Index, Windholz et al., eds. Merck & Co., Seite 1183, 1983).

15 In der EP 405370 sind Riboflavin-überproduzierende Bakterienstämme beschrieben, die durch Transformation der Riboflavin-Biosynthese-Gene aus *Bacillus subtilis* erhalten wurden.

Da die Genetik der Riboflavin-Biosynthese in Bakterien und

20 Eukaryonten verschieden ist, sind die oben erwähnten Gene aus *Bacillus subtilis* nicht für ein rekombinantes Herstellungsverfahren für Riboflavin mit eukaryontischen Produktionsorganismen wie *Ashbya gossypii* geeignet.

25 In einer am 19.11.1992 beim Deutschen Patentamt eingereichten Patentanmeldung wurde die Klonierung der Riboflavin-Biosynthese Gene der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* beschrieben.

Eine Klonierung der *Ashbya gossypii* Riboflavin-Biosynthese Gene

30 unter Verwendung der *S. cerevisiae* RIB-Gene mit üblichen Hybridisierungsmethoden gelang jedoch nicht; offenbar war die Homologie der RIB-Gene aus *S. cerevisiae* und *A. gossypii* für eine Hybridisierung nicht groß genug.

35 Es bestand daher die Aufgabe, die Riboflavin-Biosynthese Gene aus einem Eukaryonten zu isolieren, um damit ein rekombinantes Herstellungsverfahren für Riboflavin in einem eukaryontischen Produktionsorganismus bereitzustellen.

40 Demgemäß wurden in dem Ascomyceten *Ashbya gossypii* sechs Gene (rib-Gene), die für Enzyme der Riboflavin-Biosynthese ausgehend von GTP codieren, gefunden und isoliert.

Die Erfindung betrifft die folgenden DNA-Sequenzen:

45

DNA-Sequenzen, die für ein Polypeptid mit der in SEQ ID NO: 2 dargestellten Aminosäuresequenz codieren oder für ein Analoges oder Derivat des Polypeptids gemäß SEQ ID NO: 2, worin eine oder mehrere Aminosäuren deletiert, hinzugefügt oder durch andere Aminosäuren substituiert worden sind, ohne die enzymatische Wirkung des Polypeptids wesentlich zu reduzieren.

DNA-Sequenzen, die für ein Polypeptid mit der in SEQ ID NO: 4 dargestellten Aminosäuresequenz codieren oder für ein Analoges oder Derivat des Polypeptids gemäß SEQ ID NO: 4, worin eine oder mehrere Aminosäuren deletiert, hinzugefügt oder durch andere Aminosäuren substituiert worden sind, ohne die enzymatische Wirkung des Polypeptids wesentlich zu reduzieren.

DNA-Sequenzen, die für ein Polypeptid mit der in SEQ ID NO: 6 dargestellten Aminosäuresequenz codieren oder für ein Analoges oder Derivat des Polypeptids gemäß SEQ ID NO: 6, worin eine oder mehrere Aminosäuren deletiert, hinzugefügt oder durch andere Aminosäuren substituiert worden sind, ohne die enzymatische Wirkung des Polypeptids wesentlich zu reduzieren.

DNA-Sequenzen, die für ein Polypeptid mit der in SEQ ID NO: 8 dargestellten Aminosäuresequenz codieren oder für ein Analoges oder Derivat des Polypeptids gemäß SEQ ID NO: 8, worin eine oder mehrere Aminosäuren deletiert, hinzugefügt oder durch andere Aminosäuren substituiert worden sind, ohne die enzymatische Wirkung des Polypeptids wesentlich zu reduzieren.

DNA-Sequenzen, die für ein Polypeptid mit der in SEQ ID NO: 10 dargestellten Aminosäuresequenz codieren oder für ein Analoges oder Derivat des Polypeptids gemäß SEQ ID NO: 10, worin eine oder mehrere Aminosäuren deletiert, hinzugefügt oder durch andere Aminosäuren substituiert worden sind, ohne die enzymatische Wirkung des Polypeptids wesentlich zu reduzieren.

DNA-Sequenzen, die für ein Polypeptid mit der in SEQ ID NO: 12 dargestellten Aminosäuresequenz codieren oder für ein Analoges oder Derivat des Polypeptids gemäß SEQ ID NO: 12, worin eine oder mehrere Aminosäuren deletiert, hinzugefügt oder durch andere Aminosäuren substituiert worden sind, ohne die enzymatische Wirkung des Polypeptids wesentlich zu reduzieren.

Die Gene und ihre Genprodukte (Polypeptide) sind im Sequenzprotokoll mit ihrer Primärstruktur aufgeführt und haben folgende Zuordnung:

SEQ ID NO: 1 : rib 1-Gen

- SEQ ID NO: 2 : rib 1-Genprodukt (GTP-cyclohydrolase II)
SEQ ID NO: 3 : rib 2-Gen
SEQ ID NO: 4 : rib 2-Genprodukt (DRAP-Deaminase)
SEQ ID NO: 5 : rib 3-Gen
5 SEQ ID NO: 6 : rib 3-Genprodukt (DBP-Synthase)
SEQ ID NO: 7 : rib 4-Gen
SEQ ID NO: 8 : rib 4-Genprodukt (DMRL-Synthase)
SEQ ID NO: 9 : rib 5-Gen
SEQ ID NO: 10: rib 5-Genprodukt (Riboflavin-Synthase)
10 SEQ ID NO: 11: rib 7-Gen
SEQ ID NO: 12: rib 7-Genprodukt (HTP-Reductase)

Guanosintriphosphat (GTP) wird durch GTP-Cyclohydrolase II (rib 1-Genprodukt) zu 2,5-Diamino-6-ribosylamino-4-(3H)-pyrimidinon-
15 5-phosphat umgewandelt. Diese Verbindung wird anschließend durch rib 7-Genprodukt zu 2,5-Diamino-ribitylamino-2,4 (1H,3H)-pyrimidin-5-phosphat reduziert und dann durch rib 2-Genprodukt zum 5-Amino-6-ribitylamino-2,4 (1H,3H)-pyrimidindion deaminiert. Anschließend wird in einer rib 4-Genprodukt katalysierten Reaktion die C4-Verbindung DBP hinzugefügt und es entsteht
20 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin (DMRL), aus dem in der rib 5-Genprodukt katalysierten Reaktion Riboflavin entsteht. Die C4-Verbindung DBP (L-3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat) wird aus D-Ribulose-5-phosphat in einer rib 3-Genprodukt katalysierten
25 Reaktion gebildet.

Die in SEQ ID NO: 1,3,5,7,9,11 beschriebenen DNA-Sequenzen codieren für die Polypeptide, die in SEQ ID NO: 2,4,6,8,10,12 beschrieben sind.

30 Außer den im Sequenzprotokoll genannten DNA-Sequenzen sind auch solche geeignet, die infolge der Degeneration des genetischen Codes eine andere DNA Sequenz besitzen, jedoch für das gleiche Polypeptid codieren.

35 Weiterhin sind auch solche DNA Sequenzen Gegenstand der Erfindung, die für ein Genprodukt (Polypeptid) mit anderer als der im Sequenzprotokoll aufgeführten Primärstruktur codieren, solange das Genprodukt noch im wesentlichen die gleichen biologischen Eigenschaften wie das im Sequenzprotokoll genannte Genprodukt besitzt. Unter biologischen Eigenschaften sind vor allem die die Biosynthese von Riboflavin bewirkenden enzymatischen Aktivitäten zu verstehen.

45 Solche veränderten Genprodukte mit im wesentlichen gleichen biologischen Eigenschaften sind durch Deletion oder Hinzufügen von einer oder mehreren Aminosäuren oder Peptiden oder durch Aus-

tausch von Aminosäuren durch andere Aminosäuren erhältlich oder können aus anderen Organismen als *Ashbya gossypii* isoliert werden.

- 5 Die DNA-Sequenzen, die für die veränderten Genprodukte codieren, sind zu den DNA-Sequenzen gemäß Sequenzprotokoll in der Regel zu 80 oder mehr Prozent homolog. Solche DNA-Sequenzen lassen sich ausgehend von den in SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11 beschriebenen DNA-Sequenzen, beispielsweise mit üblichen Hybridisierverfahren
- 10 oder der PCR-Technik aus anderen Eukaryonten als *Ashbya gossypii* isolieren. Diese DNA-Sequenzen hybridisieren unter Standardbedingungen mit den in SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11 beschriebenen DNA-Sequenzen.
- 15 Unter Standardbedingungen sind beispielsweise Temperaturen zwischen 42 und 58°C in einer wäßrigen Pufferlösung mit einer Konzentration zwischen 0,1 und 1 x SSC (1 x SSC: 0,15M NaCl, 15mM Natriumcitrat pH 7,2) zu verstehen. Die experimentellen Bedingungen für DNA-Hybridisierungen sind in Lehrbüchern der Gentechnik,
- 20 beispielsweise in Sambrook et al., "Molecular Cloning", Cold Spring Harbor Laboratory, 1989, beschrieben.

- Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind Regulationssequenzen, insbesondere Promotorsequenzen, die in 5'-Richtung vor den für
- 25 die entsprechenden Polypeptid codierenden DNA-Sequenzen liegen. Die Regulationssequenzen sind im Sequenzprotokoll aufgeführt und im folgenden näher erläutert.

Regulationssequenz für rib 1-Gen:

- 30 SEQ ID NO: 1 Nukleotid 1-242

Regulationssequenz für rib 2-Gen:

SEQ ID NO: 3 Nukleotid 1-450

- 35 Regulationssequenz für rib 3-Gen:

SEQ ID NO: 5 Nukleotid 1-314

Regulationssequenz für rib 4-Gen:

SEQ ID NO: 7 Nukleotid 1-270

40

Regulationssequenz für rib 5-Gen:

SEQ ID NO: 9 Nukleotid 1-524

Regulationssequenz für rib 7-Gen:

- 45 SEQ ID NO: 11 Nukleotid 1-352

Die Regulationssequenzen können auch noch in 5'- und/oder 3'-Richtung verkürzt werden, ohne daß ihre Funktion wesentlich nachläßt.

- 5 Essentiell für die Regulationswirkung sind in der Regel Fragmente von 30 bis 100, bevorzugt 40 bis 70 Nukleotiden aus den oben angegebenen Sequenzbereichen.

Diese Regulationssequenzen können auch durch gerichtete

- 10 Mutagenese im Vergleich zu den natürlichen Sequenzen in ihrer Funktion optimiert werden.

Die erfindungsgemäßen Regulationssequenzen eignen sich für die Überexpression von Genen in *Ashbya*, insbesondere von Genen, die

- 15 für die Riboflavin-Biosynthese verantwortlich sind.

Weiterhin sind Gegenstand der Erfindung Expressionsvektoren, die eine oder mehrere der erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen enthalten.

- 20 Solche Expressionsvektoren erhält man, indem man die erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen mit geeigneten funktionellen Regulationssignalen versieht. Solche Regulationssignale sind DNA-Sequenzen, die für die Expression verantwortlich sind, beispielsweise Promotoren, Operatoren, Enhancer, ribosomale Bindungsstellen, und die vom Wirtsorganismus erkannt und bedient werden.

25

Gegebenenfalls können noch weitere Regulationssignale, die beispielsweise Replikation oder Rekombination der rekombinanten DNA im Wirtsorganismus steuern, Bestandteil des Expressionsvektors sein.

30

Ebenso gehören die mit den erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen oder Expressionsvektoren transformierten Wirtsorganismen zum Gegenstand der Erfindung. Bevorzugt werden als Wirtsorganismen eukaryontische Organismen, besonders bevorzugt solche der Gattung

- 35 *Saccharomyces*, *Candida*, *Pichia*, *Eremothecium* oder *Ashbya* verwendet. Besonders bevorzugte Arten sind *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida flaveri*, *Candida famata*, *Eremothecium ashbyii* und *Ashbya gossypii*.

- 40 Weiterhin gehört zur Erfindung ein rekombinantes Herstellungsverfahren für Riboflavin, in dem die erfindungsgemäßen transformierten Wirtsorganismen in an sich bekannter Weise durch Fermentation gezüchtet werden und das während der Fermentation gebildete Riboflavin aus dem Fermentationsmedium isoliert und

- 45 gegebenenfalls gereinigt wird.

Die rib⁻-Gene und -Genprodukte lassen sich wie im Beispiel und im Sequenzprotokoll beschrieben isolieren und charakterisieren.

Beispiel 1

5 Isolierung der *Ashbya gossypii* Riboflavin Biosynthese Gene (rib-Gene)

a. Konstruktion einer *Ashbya gossypii* cDNA-Bank

10 Gesamt RNA wurde aus dem Mycel des Riboflavin überproduzierenden Stammes *Ashbya gossypii* ATCC 10195 nach Züchtung auf YEPD Medium (Sherman et al., "Methods in yeast genetics", Cold Spring Harbor, New York, 1989) in der späten logarithmischen Wachstumsphase extrahiert.

15

Poly(A)⁺ RNA wurde durch zweimalige Adsorption und Elution an oligo(dT)-Cellulose gereinigt (Aviv und Leder, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 1972, 1408-1412). Die cDNA wurde nach der allgemeinen Vorschrift von Gubler und Hoffmann isoliert (Gene 25, 1983, 263)

20 und synthetische EcoRI-Adaptoren wurden an die Enden der blunt-end cDNA-Moleküle hinzugefügt. Die EcoRI nachgeschnittenen cDNA Fragmente wurden anschließend mittels T4 Polynukleotidkinase phosphoryliert und in den dephosphorylierten EcoRI geschnittenen Vektor pYEura3 kloniert (Fig. 1). pYEura3 (Clonotech

25 Laboratories, Inc., Kalifornien) ist ein Hefe-Expressionsvektor, der die Galaktose-induzierbaren GAL1 und GAL10 Promotoren und URA, CEN4 und ARS1 beinhaltet. Diese Hefeelemente erlauben die Transformation und Expression klonierter DNA-Fragmente in Hefezellen.

30

Aliquots der Ligationsreaktion wurden benutzt um hochkompetente (Hanahan, DNA Cloning, ed. D.M. Glover; IRL Press, Oxford 1985, 109) *E. coli* XL1-Blue (Bullock et al., Biotechniques 5 (1987) 376-378) zu transformieren und Transformanten wurden auf Basis

35 ihrer Ampicillinresistenz selektioniert.

Etwa 3×10^5 ampicillinresistente Zellen wurden vereinigt, amplifiziert und daraus Plasmid-DNA isoliert (Birnboim und Doly, Nucleic Acids Res. 7, 1979, 1513).

40

b. Isolierung von *Ashbya gossypii* cDNA-Klonen, die für riboflavinbildende Enzyme codieren

45

cDNA-Klone von *Ashbya gossypii*, die für riboflavinbildende Enzyme codieren, wurden durch funktionelle Komplementation von *Saccharomyces cerevisiae* Mutanten, die in der Riboflavin-Biosynthese betroffen sind, isoliert.

5

Die Stämme AJ88 (Mata leu2 his3 rib1::URA3 ura3-52), AJ115 (Matalpha leu2 inos1 rib2::URA3 ura3-52), AJ71 (Matalpha leu2 inos1 rib3::URA3 ura3-52), AJ106 (Matalpha leu2 inos1 rib4::URA3 ura3-52), AJ66 (Mata canR inos1 rib5::URA3 ura3-52) und AJ121

10 (Matalpha leu2 inos1 rib7::URA3 ura3-52) sind mutierte Stämme, die durch Zerstörung eines der sechs Gene (RIB1 bis RIB5 und RIB7), die in die Riboflavinbiosynthese bei *Saccharomyces cerevisiae* involviert sind.

15 Diese Stämme wurden jeweils mit 25 µg cDNA aus der *Ashbya gossypii* cDNA-Bank transformiert und auf festem Galaktose-haltigem Medium ohne Riboflavin ausplattiert. Nach ungefähr einer Woche Wachstum wurden Rib+ Transformanten von den Kulturschalen isoliert.

20 Jeweils eine Transformante von jeder transformierten Mutante (Rib1+, Rib2+, Rib3+, Rib4+, Rib5+ und Rib7+) wurde analysiert und in allen Fällen wurde gefunden, daß der Rib+ Phänotyp nur in Galaktosemedium, nicht jedoch in Glucosemedium exprimiert war.

25 Diese Ergebnisse belegen, daß der Rib+ Phänotyp unter der Kontrolle des plasmidständigen galaktoseinduzierbaren GAL10 Promotors exprimiert wurde.

Plasmid-DNA wurde aus den Rib1+, Rib2+, Rib3+, Rib4+, Rib5+ und
30 Rib7+ Transformanten durch Transformation von *E. coli* isoliert und pJR715, pJR669, pJR788, pJR733, pJR681 und pJR827 genannt.

Partialsequenzierung der in diesen Plasmiden enthaltenen cDNA-Insertionen bestätigte, daß sie für Proteine codieren, die analog
35 zu Proteinen der Rib-Genprodukte aus *Saccharomyces* sind.

c. Isolierung von *Ashbya gossypii* genomischen Klonen, die für riboflavinbildende Enzyme codieren

40 Um die genomischen Kopien der riboflavinbildenden Gene von *Ashbya gossypii* zu isolieren wurde eine genomische Bank von *Ashbya gossypii* ATCC 10195 in dem Cosmid superCos1 (Stratagene Cloning Systems, Kalifornien) angelegt und mit ³²P-markierten Proben, die von den cDNA Kopien der RIB1, RIB2, RIB3, RIB4, RIB5 und RIB7
45 Gene von *Ashbya gossypii* abgeleitet waren, gescreent.

Cosmid Klone mit RIB1, RIB2, RIB3, RIB4, RIB5 und RIB7 DNA wurden isoliert durch Koloniehybridisierung (Grunstein und Hogness, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 1975, 3961-3965). Weitere Southern Analysen von enzymatisch gespaltenen Cosmid DNA unter Verwendung
5 der gleichen RIB-spezifischen cDNA Proben erlaubte die Identifizierung definierter Restriktionsfragmente, die die RIB1, RIB2, RIB3, RIB4, RIB5 und RIB7 Gene von *Ashbya gossypii* enthielten.

Ein 3,1 kb langes BamHI-ClaI DNA Fragment wurde gefunden, das das
10 gesamte RIB1 Gen von *Ashbya gossypii*, codierend für GTP-Cyclohydrolase II enthielt. Dieses Fragment wurde aus einem Agarose Gel isoliert und in den BamHI und ClaI geschnittenen pBluescript KS (+) phagemid (Stratagene Cloning Systems) kloniert und lieferte so das Plasmid pJR765 (Fig.2).

15 Eine 1329 bp lange DNA Sequenz wurde erhalten (SEQ ID NO:1), die den RIB1 offenen Leserahmen von 906 bp, 242 bp von der 5'-nichtkodierenden Region und 181 bp von der 3'-nichtkodierenden Region enthielt.

20 Das gesamte *Ashbya gossypii* RIB2 Gen, das für die DRAP-Deaminase codiert, wurde auf einem 3,0 kb langen EcoRI-PstI Fragment gefunden, das kloniert in pBluescript KS (+) das Plasmid pJR758 ergab (Fig.3).

25 Eine 2627 bp lange Region der EcoRI-PstI-Insertion mit dem offenen Leserahmen von RIB2 von 1830 bp, 450 bp der 5'-untranslatierten Region und 347 bp der 3'-untranslatierten Region wurde sequenziert (SEQ ID NO:3).

30 Das gesamte *Ashbya gossypii* RIB3 Gen, das für die DBP-Synthase codiert, wurde auf einem 1,5 kb langen PstI-HindIII Fragment gefunden, das kloniert in pBluescript KS (+) das Plasmid pJR790 ergab (Fig.4).

35 Eine 1082 bp lange Region der PstI-HindIII-Insertion mit dem offenen Leserahmen von RIB3 von 639 bp, 314 bp der 5'-untranslatierten Region und 129 bp der 3'-untranslatierten Region wurde sequenziert (SEQ ID NO:5).

40 Das *Ashbya gossypii* RIB4 Gen, das für die DMRL-Synthase codiert, wurde auf einem 3,2 kb langen PstI-PstI Fragment gefunden, das kloniert in pBluescript KS (+) das Plasmid pJR762 ergab (Fig.5).

45

Eine 996 bp lange Region der PstI-PstI-Insertion mit dem offenen Leserahmen von RIB4 von 519 bp, 270 bp der 5'-untranslatierten Region und 207 bp der 3'-untranslatierten Region wurde sequenziert (SEQ ID NO:7).

5

Das gesamte *Ashbya gossypii* RIB5 Gen, das für die Riboflavin-Synthase codiert, wurde auf einem 2,5 kb langen PstI-PstI Fragment gefunden, das kloniert in pBluescript KS (+) das Plasmid PJR739 (Fig.6) ergab.

10

Eine 1511 bp lange Region der PstI-PstI-Insertion mit dem offenen Leserahmen von RIB5 von 708 bp, 524 bp der 5'-untranslatierten Region und 279 bp der 3'-untranslatierten Region wurde sequenziert (SEQ ID NO:9).

15

Schließlich wurde das *Ashbya gossypii* RIB7 Gen, das für die HTP-Reduktase codiert, auf einem 4,1 kb langen EcoRI-EcoRI-Fragment gefunden, das kloniert in pBluescript KS (+) das Plasmid PJR845 ergab (Fig.7).

20

Eine 1596 bp lange Region der EcoRI-EcoRI-Insertion mit dem offenen Leserahmen von RIB7 von 741 bp, 352 bp der 5'-untranslatierten Region und 503 bp der 3'-untranslatierten Region wurde sequenziert (SEQ ID NO:11).

25

Beispiel 2

mRNA Analyse der *Ashbya gossypii* RIB-Gene

- 30 Um die RIB spezifischen Transkripte zu identifizieren wurden Northern Analysen durchgeführt. Gesamt RNA wurde aus dem *Ashbya gossypii* Stamm ATCC 10195 wie in Beispiel 1 beschrieben, isoliert. Die RNA Proben des Stammes (5 µg) wurden elektrophoretisch aufgetrennt auf 0,8% Agarose-Formaldehyd-Gelen zusammen mit RNA-
- 35 Größenmarkern und unter Vakuum auf Nylonmembrane geblottet (Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 1980, 5201-5205).

- Die Nylonmembranen wurden unabhängig voneinander mit ³²P-markierten RIB-spezifischen DNA-Proben bei 42°C in 5xSSC und in Gegenwart
- 40 von 50 % Formamid hybridisiert. Das *Ashbya gossypii* RIB1 Gen wird als unique Message von etwa 1150 Nukleotiden exprimiert, was in beiden Stämmen durch eine 0,7 kbp lange SmaI-SacI Probe aus dem Plasmid pJR765 (Fig. 8) nachgewiesen wurde.

- 45 Analog wurden unique 1900 Nukleotide lange RIB2-, 900 Nukleotide lange RIB3-, 800 Nukleotide lange RIB4-, 1050 Nukleotide lange RIB5- und 1000 Nukleotide lange RIB7-Transkripte in den Blots mit

Hilfe eines 0,5 kbp langen SmaI-SmaI-Fragments aus pJR758, eines 0,6 kbp langen HindIII-KpnI-Fragments aus pJR790, eines 0,5 kbp langen ScaI-HindIII Fragments aus pJR739 und eines 0,3 kbp langen PstI-PstI-Fragments aus pJR845 als spezifischer Probe nachge-
5 wiesen.

Beispiel 3

Expression der Ashbya gossypii RIB-Gene in Saccharomyces 10 cerevisiae

Wie in Beispiel 1 beschrieben, können gut untersuchte Mutanten von Saccharomyces cerevisiae, die in einer Stufe der Riboflavinbiosynthese defekt sind, auf Kulturmedien ohne Riboflavin wach-
15 sen, wenn sie ein Plasmid tragen, das für die komplementierenden Enzyme von Ashbya codiert. Um die Funktion der Ashbya gossypii RIB Genprodukte zu testen wurden flavinbildende Enzymaktivitäten in zellfreien Extrakten von S. cerevisiae- Mutanten gemessen, die eines der Expressionsplasmide pJR715, pJR669, pJR788, pJR733,
20 pJR681 und pJR827 trugen.

Diese in Beispiel 1 beschriebenen von pYEura3 abgeleiteten Plasmide enthalten Ashbya gossypii RIB-spezifische cDNA-Fragmente unter der Kontrolle des galaktoseinduzierbaren GAL10 Promotors.
25

Zellfreie Proteinextrakte von S. cerevisiae wurden aus Kulturen gewonnen, die in Flüssigmedium bis zu einer optischen Dichte von etwa 2 OD gewachsen waren.

30 Die Zellen wurden geerntet, mit kaltem 20 mM Tris HCl, pH 7,5 gewaschen und im gleichen Puffer, der mit 1 mM Phenylethylsulfonylfluorid supplementiert war, resuspendiert.

Zell-Lysate wurden durch Vortexen in Gegenwart von Glaskugeln und
35 Zentrifugation bei 3000 g für 20 min. bei 4°C hergestellt.

GTP-Cyclohydrolase II, DRAP-Deaminase, DBP-Synthase, DMRL-Synthase, Riboflavin-Synthase und HTP-Reduktase Enzymaktivitäten wurden bestimmt wie in der Literatur beschrieben (Shavlovsky et
40 al, Arch. Microbiol. 124 1980, 255-259; Richter et al., J. Bacteriol. 175, 1993, 4045-4051; Klein und Bacher, Z. Naturforsch. 35b, 1980, 482-484; Richter et al. J. Bacteriol. 174, 1992, 4050-4056; Nielsen et al. J. Biol. Chem. 261, 1986, 3661; Plaut und Harvey, Methods Enzymol. 18B, 1971, 515-538; Hollander und
45 Brown, Biochem. Biophys. Res. Commun. 89, 1979, 759-763; Shavlovski et al., Biochim. Biophys. Acta, 428, 1976, 611-618).

Protein-wurde nach der Methode von Peterson quantifiziert (Anal. Biochem. 83, 1977, 346-356). Wie aus Tab. 1 ersichtlich, bewirkt das Plasmid pJR715 die Expression von GTP-Cyclohydrolase II Aktivität in der *S. cerevisiae* Mutante AJ88. Weiterhin ist diese

5 Aktivität nur vorhanden in Zellen, die auf Galaktosemedium gewachsen sind, was darauf hinweist, daß die RIB1 cDNA Expression von *Ashbya gossypii* unter der Kontrolle des galaktoseinduzierbaren GAL10-Promotors erfolgt.

10 Daher belegen diese Ergebnisse, daß RIB1 für die GTP-Cyclohydrolase II in *Ashbya gossypii* codiert. Auf analoge Art wurde gezeigt daß RIB2 für DRAP-Deaminase, RIB3 für DBP-Synthase, RIB4 für DMRL-Synthase, RIB5 für Riboflavinsynthase und RIB7 für HTP-Reduktase in diesem Pilz codiert.

15

Tab. 1

GTP-Cyclohydrolase II Aktivität der *S. cerevisiae* RIB1 Mutante AJ88 und ihrer Transformanden.

20	Stamm	Plasmid	GTP-Cyclohydrolase II U/mg Protein **)	
			Glucose	Galaktose
	X 2180-1A*	-	0,48	0,34
	AJ 88	-	n.d.	n.d.
25	AJ 88	pIR715	n.d.	21,60

n.d.: not detected

*) Wildtyp

**) Einheiten GTP-Cyclohydrolase II Aktivitäten

30 1U katalysiert die Bildung von 1 nmol HTP pro Stunde

35

40

45

Tab.2

DRAP-Deaminase Aktivität der *S. cerevisiae* RIB2 Mutante AJ115 und ihrer Transformanden.

5	Stamm	Plasmid	DRAP-Deaminase U/mg Protein *)	
			Glucose	Galaktose
	X 2180-1A	-	0,45	0,38
	AJ 115	-	n.d.	n.d.
10	AJ 115	pIR669	n.d.	53,22

n.d.:not detected

*) 1U katalysiert die Bildung von 1 nmol ARAP pro Stunde

Tab.3

15 DBP-Synthase Aktivität der *S. cerevisiae* RIB3 Mutante AJ71 und ihrer Transformanden.

20	Stamm	Plasmid	DBP-Synthase U/mg Protein *)	
			Glucose	Galaktose
	X 2180-1A	-	0,80	0,75
	AJ 71	-	n.d.	n.d.
	AJ 71	pIR788	n.d.	25,19

25 n.d.:not detected

*) 1U katalysiert die Bildung von 1 nmol DBP pro Stunde

Tab.4

30 GTP-Cyclohydrolase II Aktivität der *S. cerevisiae* RIB4 Mutante AJ106 und ihrer Transformande.

35	Stamm	Plasmid	DMRL-Synthase U/mg Protein *)	
			Glucose	Galaktose
	X 2180-1A	-	2,04	1,73
	AJ 106	-	n.d.	n.d.
	AJ 106	pIR733	n.d.	86,54

n.d.:not detected

*) 1U katalysiert die Bildung von 1 nmol DMRL pro Stunde

Tab.5

Riboflavin-Synthase Aktivität der *S. cerevisiae* RIB5 Mutante AJ66 und ihrer Transformande.

5	Stamm	Plasmid	Riboflavin-Synthase U/mg Protein *)	
			Glucose	Galaktose
	X 2180-1A	-	4,41	3,80
	AJ 66	-	n.d.	n.d.
10	AJ 66	pIR681	n.d.	164,20

n.d.:not detected

*) 1U katalysiert die Bildung von 1 nmol Riboflavin pro Stunde

Tab.6

15 HTP-Reduktase Aktivität der *S. cerevisiae* RIB7 Mutante AJ121 und ihrer Transformande.

20	Stamm	Plasmid	HTP-Reductase U/mg Protein *)	
			Glucose	Galaktose
	X 2180-1A	-	1,86	2,54
	AJ 121	-	n.d.	n.d.
	AJ 121	pIR827	n.d.	46,21

25 n.d.:not detected

*) 1U katalysiert die Bildung von 1 nmol DRAP pro Stunde

30

35

40

45

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALGEMEINE INFORMATION:

(i) ANMELDER:

- (A) NAME: BASF Aktiengesellschaft
- (B) STRASSE: Carl-Bosch-Strasse 38
- (C) ORT: Ludwigshafen
- (E) LAND: Bundesrepublik Deutschland
- (F) POSTLEITZAHL: D-67056
- (G) TELEPHON: 0621/6048526
- (H) TELEFAX: 0621/6043123
- (I) TELEX: 1762175170

(ii) ANMELDETITEL: Riboflavin-Biosynthese in Pilzen

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 12

(iv) COMPUTER-LESBARE FORM:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (EPA)

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 1329 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Doppel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNS zu mRNS

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iii) ANTISENSE: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Ashbya gossypii

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: 5'UTR
- (B) LAGE: 1..242

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LAGE: 243..1148

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: 3'UTR
- (B) LAGE: 1149..1329

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

TTTCTGTCCG CATACTTCAT ATGCTCATCG CACATTGATA ATGTACATTC GAAAAATTC	60
AAGATTAGCC TCCGTGAACA GCGATTTACC TTAGGCAAAA GTAACAAAAG GCTTTTCCGT	120
AGGTGCTTTG TCATTCAACA ATCCACGTCG GAATTGGCGA CTATATAGTG TAGGGCCCAT	180
AAAGCAGTAG TCGGTGTTGA TAGCTGTGTC AGACCAACTC TTTGTTAATT ACTGAAGCTG	240
AT ATG ACT GAA TAC ACA GTG CCA GAA GTG AGG TGT GTC GCA CGC GCG	287
Met Thr Glu Tyr Thr Val Pro Glu Val Arg Cys Val Ala Arg Ala	

15

CGC ATA CCG ACG GTA CAG GGC ACC GAT GTC TTC CTC CAT CTA TAC CAC	335
Arg Ile Pro Thr Val Gln Gly Thr Asp Val Phe Leu His Leu Tyr His	
20 25 30	
AAC TCG ATC GAC AGC AAG GAA CAC CTA GCG ATT GTC TTC GGC GAG AAC	383
Asn Ser Ile Asp Ser Lys Glu His Leu Ala Ile Val Phe Gly Glu Asn	
35 40 45	
ATA CGC TCG CGG AGT CTG TTC CGG TAC CGG AAA GAC GAC ACG CAG CAG	431
Ile Arg Ser Arg Ser Leu Phe Arg Tyr Arg Lys Asp Asp Thr Gln Gln	
50 55 60	
GCG CGG ATG GTG CGG GGC GCC TAC GTG GGC CAG CTG TAC CCC GGG CGG	479
Ala Arg Met Val Arg Gly Ala Tyr Val Gly Gln Leu Tyr Pro Gly Arg	
65 70 75	
ACC GAG GCA GAC GCG GAT CGG CGT CAG GGC CTG GAG CTG CGG TTT GAT	527
Thr Glu Ala Asp Ala Asp Arg Arg Gln Gly Leu Glu Leu Arg Phe Asp	
80 85 90 95	
GAG ACA GGG CAG CTG GTG GTG GAG CGG GCG ACG ACG TGG ACC AGG GAG	575
Glu Thr Gly Gln Leu Val Val Glu Arg Ala Thr Thr Trp Thr Arg Glu	
100 105 110	
CCG ACA CTG GTG CGG CTG CAC TCG GAG TGT TAC ACG GGC GAG ACG GCG	623
Pro Thr Leu Val Arg Leu His Ser Glu Cys Tyr Thr Gly Glu Thr Ala	
115 120 125	
TGG AGC GCG CGG TGC GAC TGC GGG GAG CAG TTC GAC CAG GCG GGT AAG	671
Trp Ser Ala Arg Cys Asp Cys Gly Glu Gln Phe Asp Gln Ala Gly Lys	
130 135 140	
CTG ATG GCT GCG GCG ACA GAG GGC GAG GTG GTT GGC GGT GCG GGG CAC	719
Leu Met Ala Ala Ala Thr Glu Gly Glu Val Val Gly Gly Ala Gly His	
145 150 155	
GGC GTG ATC GTG TAC CTG CGG CAG GAG GGC CGC GGC ATC GGG CTA GGC	767
Gly Val Ile Val Tyr Leu Arg Gln Glu Gly Arg Gly Ile Gly Leu Gly	
160 165 170 175	
GAG AAG CTG AAG GCG TAC AAC CTG CAG GAC CTG GGC GCG GAC ACG GTG	815
Glu Lys Leu Lys Ala Tyr Asn Leu Gln Asp Leu Gly Ala Asp Thr Val	
180 185 190	
CAG GCG AAC GAG CTG CTC AAC CAC CCT GCG GAC GCG CGC GAC TTC TCG	863
Gln Ala Asn Glu Leu Leu Asn His Pro Ala Asp Ala Arg Asp Phe Ser	
195 200 205	
TTG GGG CGC GCA ATC CTA CTG GAC CTC GGT ATC GAG GAC ATC CGG TTG	911
Leu Gly Arg Ala Ile Leu Leu Asp Leu Gly Ile Glu Asp Ile Arg Leu	
210 215 220	
CTC ACG AAT AAC CCC GAC AAG GTG CAG CAG GTG CAC TGT CCG CCG GCG	959
Leu Thr Asn Asn Pro Asp Lys Val Gln Gln Val His Cys Pro Pro Ala	
225 230 235	
CTA CGC TGC ATC GAG CGG GTG CCC ATG GTG CCG CTT TCA TGG ACT CAG	1007
Leu Arg Cys Ile Glu Arg Val Pro Met Val Pro Leu Ser Trp Thr Gln	
240 245 250 255	

16

CCC ACA CAG GGC GTG CGC TCG CGC GAG CTG GAC GGC TAC CTG CGC GCC 1055
 Pro Thr Gln Gly Val Arg Ser Arg Glu Leu Asp Gly Tyr Leu Arg Ala
 260 265 270
 AAG GTC GAG CGC ATG GGG CAC ATG CTG CAG CGG CCG CTG GTG CTG CAC 1103
 Lys Val Glu Arg Met Gly His Met Leu Gln Arg Pro Leu Val Leu His
 275 280 285
 ACG TCT GCG GCG GCC GAG CTC CCC CGC GCC AAC ACA CAC ATA TAATCTTTGC 1155
 Thr Ser Ala Ala Ala Glu Leu Pro Arg Ala Asn Thr His Ile
 290 295 300
 TATATTAAAA CTCTATAAAC GTATGCCACA CGGCGCCCGC GGGCTGCCAC ACGCTGCTCA 1215
 CGGGCTGCCG AACAGTTCTA ACAAGTAATC GCGCGCCTCG CCAGTGATCG TGGCGAGCAC 1275
 CTTGTCGTCC ATCATCACAT ATCCTCGGCT ACAGTCGTCTG TTGAAGAGCG TGCA 1329

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 301 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

Met Thr Glu Tyr Thr Val Pro Glu Val Arg Cys Val Ala Arg Ala Arg
 1 5 10 15
 Ile Pro Thr Val Gln Gly Thr Asp Val Phe Leu His Leu Tyr His Asn
 20 25 30
 Ser Ile Asp Ser Lys Glu His Leu Ala Ile Val Phe Gly Glu Asn Ile
 35 40 45
 Arg Ser Arg Ser Leu Phe Arg Tyr Arg Lys Asp Asp Thr Gln Gln Ala
 50 55 60
 Arg Met Val Arg Gly Ala Tyr Val Gly Gln Leu Tyr Pro Gly Arg Thr
 65 70 75 80
 Glu Ala Asp Ala Asp Arg Arg Gln Gly Leu Glu Leu Arg Phe Asp Glu
 85 90 95
 Thr Gly Gln Leu Val Val Glu Arg Ala Thr Thr Trp Thr Arg Glu Pro
 100 105 110
 Thr Leu Val Arg Leu His Ser Glu Cys Tyr Thr Gly Glu Thr Ala Trp
 115 120 125
 Ser Ala Arg Cys Asp Cys Gly Glu Gln Phe Asp Gln Ala Gly Lys Leu
 130 135 140
 Met Ala Ala Ala Thr Glu Gly Glu Val Val Gly Gly Ala Gly His Gly
 145 150 155 160
 Val Ile Val Tyr Leu Arg Gln Glu Gly Arg Gly Ile Gly Leu Gly Glu
 165 170 175
 Lys Leu Lys Ala Tyr Asn Leu Gln Asp Leu Gly Ala Asp Thr Val Gln
 180 185 190
 Ala Asn Glu Leu Leu Asn His Pro Ala Asp Ala Arg Asp Phe Ser Leu
 195 200 205
 Gly Arg Ala Ile Leu Leu Asp Leu Gly Ile Glu Asp Ile Arg Leu Leu
 210 215 220

Thr Asn Asn Pro Asp Lys Val Gln Gln Val His Cys Pro Pro Ala Leu
 225 230 235 240
 Arg Cys Ile Glu Arg Val Pro Met Val Pro Leu Ser Trp Thr Gln Pro
 245 250 255
 Thr Gln Gly Val Arg Ser Arg Glu Leu Asp Gly Tyr Leu Arg Ala Lys
 260 265 270
 Val Glu Arg Met Gly His Met Leu Gln Arg Pro Leu Val Leu His Thr
 275 280 285
 Ser Ala Ala Ala Glu Leu Pro Arg Ala Asn Thr His Ile
 290 295 300

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 2627 Basenpaare

(B) ART: Nukleinsäure

(C) STRANGFORM: Doppel

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNS zu mRNS

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iii) ANTISENSE: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: *Ashbya gossypii*

(ix) MERKMALE:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: 5'UTR

(B) LÄNGE: 1..450

(ix) MERKMALE:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS

(B) LÄNGE: 451..2280

(ix) MERKMALE:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: 3'UTR

(B) LÄNGE: 2281..2627

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

CTGCAGGACA ATTTAAATTA CGATTACACG CGGCAGCCTT CTTGGTGCGA CAGGATTTTG 60
 TACAAGAATG ACCCCAAGCG GGTAAGAGTT CATAGGTATG CCTCGATTGA TAGACGTTCC 120
 ATTTTGAATT ATACTGATCA CGAACCCGTA ACGCTCGATG TCAGCGTTTC ATGCCATACA 180
 CAATTTGTCC CAATGGCTAT GCAGAATATT TCCCCACAGA GCACCATGGA AATGTATGTG 240
 GGAGACGTCA CAGATATACT ACTGATGTTG TTCTCCAGAG TATACTACGC CCCTACCATA 300
 TTCGATCTTG TGGTATTGAC GATATTCCTC TGTTTGTTT TACTGGCACT ATTCCGTTTG 360
 ACGGTATAGC GCTATTCGTT CATAGTGACA CATGCGGCAC TAGCTATTCA GCGAATCCTT 420
 TATAAACTGC TACTTAACGT TCGTAACACC ATG CTC AAA GGC GTT CCT GGC CTT 474
 Met Leu Lys Gly Val Pro Gly Leu
 1 5
 CTT TTT AAG GAG ACG CAA CGT CAT CTG AAA CCC AGG CTG GTT AGG ATT 522
 Leu Phe Lys Glu Thr Gln Arg His Leu Lys Pro Arg Leu Val Arg Ile
 10 15 20
 ATG GAA AAC ACA TCG CAG GAT GAG AGT CGC AAA AGA CAG GTC GCT TCG 570
 Met Glu Asn Thr Ser Gln Asp Glu Ser Arg Lys Arg Gln Val Ala Ser
 25 30 35 40

AAC TTG AGC AGC GAT GCC GAT GAG GGC TCG CCG GCA GTT ACG AGG CCG	618
Asn Leu Ser Ser Asp Ala Asp Glu Gly Ser Pro Ala Val Thr Arg Pro	
45 50 55	
GTT AAA ATC ACC AAA CGC CTC AGG AAG AAG AAC CTC GGG ACA GGC GAG	666
Val Lys Ile Thr Lys Arg Leu Arg Lys Lys Asn Leu Gly Thr Gly Glu	
60 65 70	
CTA CGG GAC AAA GCA GGA TTC AAG TTG AAG GTG CAA GAC GTG AGC AAA	714
Leu Arg Asp Lys Ala Gly Phe Lys Leu Lys Val Gln Asp Val Ser Lys	
75 80 85	
AAC CGT CAC AGA CAG GTC GAT CCG GAA TAC GAA GTC GTG GTA GAT GGC	762
Asn Arg His Arg Gln Val Asp Pro Glu Tyr Glu Val Val Val Asp Gly	
90 95 100	
CCG ATG CGC AAG ATC AAA CCG TAT TTC TTC ACA TAC AAG ACT TTC TGC	810
Pro Met Arg Lys Ile Lys Pro Tyr Phe Phe Thr Tyr Lys Thr Phe Cys	
105 110 115 120	
AAG GAG CGC TGG AGA GAT CGG AAG TTG CTT GAT GTG TTT GTG GAT GAA	858
Lys Glu Arg Trp Arg Asp Arg Lys Leu Leu Asp Val Phe Val Asp Glu	
125 130 135	
TTT CGG GAC CGC GAT AGG CCT TAC TAC GAG AAA GTC ATC GGT TCG GGT	906
Phe Arg Asp Arg Asp Arg Pro Tyr Tyr Glu Lys Val Ile Gly Ser Gly	
140 145 150	
GGT GTG CTC CTG AAC GGT AAG TCA TCG ACG TTA GAT AGC GTA TTG CGT	954
Gly Val Leu Leu Asn Gly Lys Ser Ser Thr Leu Asp Ser Val Leu Arg	
155 160 165	
AAT GGA GAC CTC ATT TCG CAC GAG CTG CAC CGT CAT GAG CCA CCG GTC	1002
Asn Gly Asp Leu Ile Ser His Glu Leu His Arg His Glu Pro Pro Val	
170 175 180	
TCC TCT AGG CCG ATT AGG ACG GTG TAC GAA GAT GAT GAC ATC CTG GTG	1050
Ser Ser Arg Pro Ile Arg Thr Val Tyr Glu Asp Asp Asp Ile Leu Val	
185 190 195 200	
ATT GAC AAG CCC AGC GGG ATT CCA GCC CAT CCC ACC GGG CGT TAC CGC	1098
Ile Asp Lys Pro Ser Gly Ile Pro Ala His Pro Thr Gly Arg Tyr Arg	
205 210 215	
TTC AAC TCC ATT ACG AAA ATA CTT GAA AAA CAG CTT GGA TAC ACT GTT	1146
Phe Asn Ser Ile Thr Lys Ile Leu Glu Lys Gln Leu Gly Tyr Thr Val	
220 225 230	
CAT CCA TGT AAC CGA CTG GAC CGC CTA ACC AGT GGC CTA ATG TTC TTG	1194
His Pro Cys Asn Arg Leu Asp Arg Leu Thr Ser Gly Leu Met Phe Leu	
235 240 245	
GCA AAA ACT CCA AAG GGA GCC GAT GAG ATG GGT GAT CAG ATG AAG GCG	1242
Ala Lys Thr Pro Lys Gly Ala Asp Glu Met Gly Asp Gln Met Lys Ala	
250 255 260	
CGC GAA GTG AAG AAA GAA TAT GTT GCC CGG GTT GTT GGG GAA TTT CCT	1290
Arg Glu Val Lys Lys Glu Tyr Val Ala Arg Val Val Gly Glu Phe Pro	
265 270 275 280	

ATA GGT GAG ATA GTT GTG GAT ATG CCA CTG AAG ACT ATA GAG CCG AAG	1338
Ile Gly Glu Ile Val Val Asp Met Pro Leu Lys Thr Ile Glu Pro Lys	
285 290 295	
CTT GCC CTA AAC ATG GTT TGC GAC CCG GAA GAC GAA GCG GGC AAG GGC	1386
Leu Ala Leu Asn Met Val Cys Asp Pro Glu Asp Glu Ala Gly Lys Gly	
300 305 310	
GCT AAG ACG CAG TTC AAA AGA ATC AGC TAC GAT GGA CAA ACG AGC ATA	1434
Ala Lys Thr Gln Phe Lys Arg Ile Ser Tyr Asp Gly Gln Thr Ser Ile	
315 320 325	
GTC AAG TGC CAA CCG TAC ACG GGC CGG ACG CAT CAG ATC CGT GTT CAC	1482
Val Lys Cys Gln Pro Tyr Thr Gly Arg Thr His Gln Ile Arg Val His	
330 335 340	
TTG CAA TAC CTG GGC TTC CCA ATT GCC AAC GAT CCG ATT TAT TCC AAT	1530
Leu Gln Tyr Leu Gly Phe Pro Ile Ala Asn Asp Pro Ile Tyr Ser Asn	
345 350 355 360	
CCG CAC ATA TGG GGC CCA AGT CTG GGC AAG GAA TGC AAA GCA GAC TAC	1578
Pro His Ile Trp Gly Pro Ser Leu Gly Lys Glu Cys Lys Ala Asp Tyr	
365 370 375	
AAG GAG GTC ATC CAA AAA CTA AAC GAA ATT GGT AAG ACT AAA TCT GCG	1626
Lys Glu Val Ile Gln Lys Leu Asn Glu Ile Gly Lys Thr Lys Ser Ala	
380 385 390	
GAA AGT TGG TAC CAT TCT GAT TCC CAA GGT GAA GTT TTC AAA GGG GAA	1674
Glu Ser Trp Tyr His Ser Asp Ser Gln Gly Glu Val Phe Lys Gly Glu	
395 400 405	
CAA TGC GAT GAA TGT GGC ACC GAA CTG TAC ACT GAC CCG GGC CCG AAT	1722
Gln Cys Asp Glu Cys Gly Thr Glu Leu Tyr Thr Asp Pro Gly Pro Asn	
410 415 420	
GAT CTT GAC TTA TGG TTG CAT GCA TAT CGG TAT GAA TCC ACT GAA CTG	1770
Asp Leu Asp Leu Trp Leu His Ala Tyr Arg Tyr Glu Ser Thr Glu Leu	
425 430 435 440	
GAT GAG AAC GGT GCT AAA AAG CGG AGT TAC TCT ACT GCG TTT CCT GAG	1818
Asp Glu Asn Gly Ala Lys Lys Arg Ser Tyr Ser Thr Ala Phe Pro Glu	
445 450 455	
TGG GCT CTT GAG CAG CAC GGC GAC TTC ATG CGG CTT GCC ATC GAA CAG	1866
Trp Ala Leu Glu Gln His Gly Asp Phe Met Arg Leu Ala Ile Glu Gln	
460 465 470	
GCT AAG AAA TGC CCA CCC GCG AAG ACA TCA TTT AGC GTT GGT GCC GTG	1914
Ala Lys Lys Cys Pro Pro Ala Lys Thr Ser Phe Ser Val Gly Ala Val	
475 480 485	
TTA GTT AAT GGG ACC GAG ATT TTG GCC ACT GGT TAC TCA CGG GAG CTG	1962
Leu Val Asn Gly Thr Glu Ile Leu Ala Thr Gly Tyr Ser Arg Glu Leu	
490 495 500	
GAA GGC AAC ACG CAC GCT GAA CAA TGT GCA CTT CAA AAA TAT TTT GAA	2010
Glu Gly Asn Thr His Ala Glu Gln Cys Ala Leu Gln Lys Tyr Phe Glu	
505 510 515 520	

CAA CAT AAA ACC GAC AAG GTT CCT ATT GGT ACA GTA ATA TAC ACG ACT	2058
Gln His Lys Thr Asp Lys Val Pro Ile Gly Thr Val Ile Tyr Thr Thr	
525 530 535	
ATG GAG CCT TGT TCT CTC CGT CTC AGT GGT AAT AAA CCG TGT GTT GAG	2106
Met Glu Pro Cys Ser Leu Arg Leu Ser Gly Asn Lys Pro Cys Val Glu	
540 545 550	
CGT ATA ATC TGC CAG CAG GGT AAT ATT ACT GCT GTT TTT GTT GGC GTA	2154
Arg Ile Ile Cys Gln Gln Gly Asn Ile Thr Ala Val Phe Val Gly Val	
555 560 565	
CTT GAG CCA GAC AAC TTC GTG AAG AAC AAT ACA AGT CGT GCG CTA TTG	2202
Leu Glu Pro Asp Asn Phe Val Lys Asn Asn Thr Ser Arg Ala Leu Leu	
570 575 580	
GAA CAA CAT GGT ATA GAC TAT ATT CTT GTC CCT GGG TTT CAA GAA GAA	2250
Glu Gln His Gly Ile Asp Tyr Ile Leu Val Pro Gly Phe Gln Glu Glu	
585 590 595 600	
TGT ACT GAA GCC GCA TTG AAG GGT CAT TGATTTTGCT GCGAATTGTA	2297
Cys Thr Glu Ala Ala Leu Lys Gly His	
605 610	
GATGACTTAA AATATCGAGG CGTATAATTC GTCGCATTTT ATATAGTTAT CTATGTTTAC	2357
ATGACTGTTT AAGCTTGATC TATATTTCTC AAGTGAATTG CCACATATGT TGGTACGGTA	2417
ATAAATTAAT GAGGGAGTTT TGAAATTCGC AACCAATCTT ATATACGTTT GATGATATAA	2477
ACGGATTGAG ATTCATTAAG CTACCTGATT TTCGCTGAAC TGTTTGTTAT AGGTTTTTAC	2537
AGTAAGATAG TTCCTAAGTT TGTTTATTGT CCCCAGTCGG CCAATTGTTT CCGACTTATT	2597
ATTATTACCA TTAGTGGTGT TAGTAGTATT	2627

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 609 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

Met	Leu	Lys	Gly	Val	Pro	Gly	Leu	Leu	Phe	Lys	Glu	Thr	Gln	Arg	His
1				5					10					15	
Leu	Lys	Pro	Arg	Leu	Val	Arg	Ile	Met	Glu	Asn	Thr	Ser	Gln	Asp	Glu
			20					25					30		
Ser	Arg	Lys	Arg	Gln	Val	Ala	Ser	Asn	Leu	Ser	Ser	Asp	Ala	Asp	Glu
		35				40					45				
Gly	Ser	Pro	Ala	Val	Thr	Arg	Pro	Val	Lys	Ile	Thr	Lys	Arg	Leu	Arg
	50				55				60						
Lys	Lys	Asn	Leu	Gly	Thr	Gly	Glu	Leu	Arg	Asp	Lys	Ala	Gly	Phe	Lys
65				70				75						80	
Leu	Lys	Val	Gln	Asp	Val	Ser	Lys	Asn	Arg	His	Arg	Gln	Val	Asp	Pro
			85					90					95		
Glu	Tyr	Glu	Val	Val	Val	Asp	Gly	Pro	Met	Arg	Lys	Ile	Lys	Pro	Tyr
		100					105					110			
Phe	Phe	Thr	Tyr	Lys	Thr	Phe	Cys	Lys	Glu	Arg	Trp	Arg	Asp	Arg	Lys
		115					120					125			

Leu	Leu	Asp	Val	Phe	Val	Asp	Glu	Phe	Arg	Asp	Arg	Asp	Arg	Pro	Tyr
130						135						140			
Tyr	Glu	Lys	Val	Ile	Gly	Ser	Gly	Gly	Val	Leu	Leu	Asn	Gly	Lys	Ser
145					150					155					160
Ser	Thr	Leu	Asp	Ser	Val	Leu	Arg	Asn	Gly	Asp	Leu	Ile	Ser	His	Glu
				165					170					175	
Leu	His	Arg	His	Glu	Pro	Pro	Val	Ser	Ser	Arg	Pro	Ile	Arg	Thr	Val
			180					185					190		
Tyr	Glu	Asp	Asp	Asp	Ile	Leu	Val	Ile	Asp	Lys	Pro	Ser	Gly	Ile	Pro
		195					200					205			
Ala	His	Pro	Thr	Gly	Arg	Tyr	Arg	Phe	Asn	Ser	Ile	Thr	Lys	Ile	Leu
	210					215					220				
Glu	Lys	Gln	Leu	Gly	Tyr	Thr	Val	His	Pro	Cys	Asn	Arg	Leu	Asp	Arg
225					230					235					240
Leu	Thr	Ser	Gly	Leu	Met	Phe	Leu	Ala	Lys	Thr	Pro	Lys	Gly	Ala	Asp
				245					250					255	
Glu	Met	Gly	Asp	Gln	Met	Lys	Ala	Arg	Glu	Val	Lys	Lys	Glu	Tyr	Val
			260				265						270		
Ala	Arg	Val	Val	Gly	Glu	Phe	Pro	Ile	Gly	Glu	Ile	Val	Val	Asp	Met
		275					280					285			
Pro	Leu	Lys	Thr	Ile	Glu	Pro	Lys	Leu	Ala	Leu	Asn	Met	Val	Cys	Asp
	290					295					300				
Pro	Glu	Asp	Glu	Ala	Gly	Lys	Gly	Ala	Lys	Thr	Gln	Phe	Lys	Arg	Ile
305					310					315					320
Ser	Tyr	Asp	Gly	Gln	Thr	Ser	Ile	Val	Lys	Cys	Gln	Pro	Tyr	Thr	Gly
				325					330					335	
Arg	Thr	His	Gln	Ile	Arg	Val	His	Leu	Gln	Tyr	Leu	Gly	Phe	Pro	Ile
			340				345						350		
Ala	Asn	Asp	Pro	Ile	Tyr	Ser	Asn	Pro	His	Ile	Trp	Gly	Pro	Ser	Leu
		355					360					365			
Gly	Lys	Glu	Cys	Lys	Ala	Asp	Tyr	Lys	Glu	Val	Ile	Gln	Lys	Leu	Asn
	370					375					380				
Glu	Ile	Gly	Lys	Thr	Lys	Ser	Ala	Glu	Ser	Trp	Tyr	His	Ser	Asp	Ser
385					390					395					400
Gln	Gly	Glu	Val	Phe	Lys	Gly	Glu	Gln	Cys	Asp	Glu	Cys	Gly	Thr	Glu
				405					410					415	
Leu	Tyr	Thr	Asp	Pro	Gly	Pro	Asn	Asp	Leu	Asp	Leu	Trp	Leu	His	Ala
			420				425						430		
Tyr	Arg	Tyr	Glu	Ser	Thr	Glu	Leu	Asp	Glu	Asn	Gly	Ala	Lys	Lys	Arg
		435					440					445			
Ser	Tyr	Ser	Thr	Ala	Phe	Pro	Glu	Trp	Ala	Leu	Glu	Gln	His	Gly	Asp
	450					455					460				
Phe	Met	Arg	Leu	Ala	Ile										

Ala Thr Gly Tyr Ser Arg Glu Leu Glu Gly Asn Thr His Ala Glu Gln
 500 505 510
 Cys Ala Leu Gln Lys Tyr Phe Glu Gln His Lys Thr Asp Lys Val Pro
 515 520 525
 Ile Gly Thr Val Ile Tyr Thr Thr Met Glu Pro Cys Ser Leu Arg Leu
 530 535 540
 Ser Gly Asn Lys Pro Cys Val Glu Arg Ile Ile Cys Gln Gln Gly Asn
 545 550 555 560
 Ile Thr Ala Val Phe Val Gly Val Leu Glu Pro Asp Asn Phe Val Lys
 565 570 575
 Asn Asn Thr Ser Arg Ala Leu Leu Glu Gln His Gly Ile Asp Tyr Ile
 580 585 590
 Leu Val Pro Gly Phe Gln Glu Glu Cys Thr Glu Ala Ala Leu Lys Gly
 595 600 605
 His

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 5:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 1082 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Doppel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA zu mRNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iii) ANTISENSE: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: *Ashbya gossypii*

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: 5'UTR
- (B) LAGE: 1..314

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LAGE: 315..953

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: 3'UTR
- (B) LAGE: 954..1082

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

CCCTTCTTGC ACGGTCGTTT CTGAACTCT ACGATTATTG GAACAATGAG TAAGTCCTCA 60
 AATGTACCAC CTATCTGTAG TTTACTATCG GATTTACTGG CTAAGAGCTG ACCTGTTAGG 120
 CAAGTGAAAC ATATCACATC GCCAGCAGGT TGGGCTACCA AGGATAGTTG ATGACTTCCA 180
 TCACCTATAA AAGCGGCTTG AGTGCTTTTG CAATGATTCT GTTCACATGA TGGACAAGAA 240
 ATACGTACAA AAATTTCAAC GTTTTACAAG TTCCAAGCT TAGTCAACTC ATCACCAACG 300
 ACAAACCAAG CAAC ATG ACA AGC CCA TGC ACT GAT ATC GGT ACC GCT ATA 350
 Met Thr Ser Pro Cys Thr Asp Ile Gly Thr Ala Ile

23

GAG CAG TTC AAG CAA AAT AAG ATG ATC ATC GTC ATG GAC CAC ATC TCG	398
Glu Gln Phe Lys Gln Asn Lys Met Ile Ile Val Met Asp His Ile Ser	
15 20 25	
AGA GAA AAC GAG GCC GAT CTA ATA TGT GCA GCA GCG CAC ATG ACT GCC	446
Arg Glu Asn Glu Ala Asp Leu Ile Cys Ala Ala Ala His Met Thr Ala	
30 35 40	
GAG CAA ATG GCA TTT ATG ATT CGG TAT TCC TCG GGC TAC GTT TGC GCT	494
Glu Gln Met Ala Phe Met Ile Arg Tyr Ser Ser Gly Tyr Val Cys Ala	
45 50 55 60	
CCA ATG ACC AAT GCG ATT GCC GAT AAG CTA GAC CTA CCG CTC ATG AAC	542
Pro Met Thr Asn Ala Ile Ala Asp Lys Leu Asp Leu Pro Leu Met Asn	
65 70 75	
ACA TTG AAA TGC AAG GCT TTC TCC GAT GAC AGA CAC AGC ACT GCG TAT	590
Thr Leu Lys Cys Lys Ala Phe Ser Asp Asp Arg His Ser Thr Ala Tyr	
80 85 90	
ACA ATC ACC TGT GAC TAT GCG CAC GGG ACG ACG ACA GGT ATC TCC GCA	638
Thr Ile Thr Cys Asp Tyr Ala His Gly Thr Thr Thr Gly Ile Ser Ala	
95 100 105	
CGT GAC CGG GCG TTG ACC GTG AAT CAG TTG GCG AAC CCG GAG TCC AAG	686
Arg Asp Arg Ala Leu Thr Val Asn Gln Leu Ala Asn Pro Glu Ser Lys	
110 115 120	
GCT ACC GAC TTC ACG AAG CCA GGC CAC ATT GTG CCA TTG CGT GCC CGT	734
Ala Thr Asp Phe Thr Lys Pro Gly His Ile Val Pro Leu Arg Ala Arg	
125 130 135 140	
GAC GGC GGC GTG CTC GAG CGT GAC GGG CAC ACC GAA GCG GCG CTC GAC	782
Asp Gly Gly Val Leu Glu Arg Asp Gly His Thr Glu Ala Ala Leu Asp	
145 150 155	
TTG TGC AGA CTA GCG GGT GTG CCA GAG GTC GCT GCT ATT TGT GAA TTA	830
Leu Cys Arg Leu Ala Gly Val Pro Glu Val Ala Ala Ile Cys Glu Leu	
160 165 170	
GTA AGC GAA AGG GAC GTC GGG CTG ATG ATG ACT TTG GAT GAG TGT ATA	878
Val Ser Glu Arg Asp Val Gly Leu Met Met Thr Leu Asp Glu Cys Ile	
175 180 185	
GAA TTC AGC AAG AAG CAC GGT CTT GCC CTC ATC ACC GTG CAT GAC CTG	926
Glu Phe Ser Lys Lys His Gly Leu Ala Leu Ile Thr Val His Asp Leu	
190 195 200	
AAG GCT GCA GTT GCC GCC AAG CAG TAGACGGCAA CGAGTTCTTT AAGTCGGTGT	980
Lys Ala Ala Val Ala Ala Lys Gln	
205 210	
TCATTTATGT AATATAACCAT TTCATCGAAA AAGTCAAATG GTATGAACTA GATTTATCAA	1040
TAGTATCTAA GAGTTATGGT ATTCGCAAAA GCTTATCGAT AC	1082

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 6:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 212 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

```

Met Thr Ser Pro Cys Thr Asp Ile Gly Thr Ala Ile Glu Gln Phe Lys
 1           5           10           15
Gln Asn Lys Met Ile Ile Val Met Asp His Ile Ser Arg Glu Asn Glu
          20           25           30
Ala Asp Leu Ile Cys Ala Ala Ala His Met Thr Ala Glu Gln Met Ala
          35           40           45
Phe Met Ile Arg Tyr Ser Ser Gly Tyr Val Cys Ala Pro Met Thr Asn
          50           55           60
Ala Ile Ala Asp Lys Leu Asp Leu Pro Leu Met Asn Thr Leu Lys Cys
          65           70           75           80
Lys Ala Phe Ser Asp Asp Arg His Ser Thr Ala Tyr Thr Ile Thr Cys
          85           90           95
Asp Tyr Ala His Gly Thr Thr Thr Gly Ile Ser Ala Arg Asp Arg Ala
          100          105          110
Leu Thr Val Asn Gln Leu Ala Asn Pro Glu Ser Lys Ala Thr Asp Phe
          115          120          125
Thr Lys Pro Gly His Ile Val Pro Leu Arg Ala Arg Asp Gly Gly Val
          130          135          140
Leu Glu Arg Asp Gly His Thr Glu Ala Ala Leu Asp Leu Cys Arg Leu
          145          150          155          160
Ala Gly Val Pro Glu Val Ala Ala Ile Cys Glu Leu Val Ser Glu Arg
          165          170          175
Asp Val Gly Leu Met Met Thr Leu Asp Glu Cys Ile Glu Phe Ser Lys
          180          185          190
Lys His Gly Leu Ala Leu Ile Thr Val His Asp Leu Lys Ala Ala Val
          195          200          205
Ala Ala Lys Gln
          210

```

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 7:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 996 Basenpaare

(B) ART: Nukleinsäure

(C) STRANGFORM: Doppel

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNS zu mRNS

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iii) ANTISENSE: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: *Ashbya gossypii*

(ix) MERKMALE:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: 5'UTR

(B) LAGE: 1..270

(ix) MERKMALE:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS

(B) LAGE: 271..789

(ix) MERKMALE:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: 3'UTR

(B) LAGE: 790..996

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

TGGTATAATG ATACAGGAAG TGAAAATCCG AAAGGTTTCAG ACGATGAAAA GAGTTTGAGA	60
CGCATCAATG ATCAGCTTTG AGCTATATGT AAGTCTATTA ATTGATTACT AATAGCAATT	120
TATGGTATCC TCTGTTCTGC ATATCGACGG TTCTCACGTG ATGATCAGCT TGAGGCTTCG	180
CGGATAAAGT TCCATCGATT ACTATAAAAC CATCACATTA AACGTTCACT ATAGGCATAC	240
ACACAGACTA AGTTCAAGTT AGCAGTGACA ATG ATT AAG GGA TTA GGC GAA GTT	294
Met Ile Lys Gly Leu Gly Glu Val	
1 5	
GAT CAA ACC TAC GAT GCG AGC TCT GTC GAG GTT GGC ATT GTC CAC GCG	342
Asp Gln Thr Tyr Asp Ala Ser Ser Val Glu Val Gly Ile Val His Ala	
10 15 20	
AGA TGG AAC AAG ACT GTC ATT GAC GCT CTC GAC CAA GGT GCA ATT GAG	390
Arg Trp Asn Lys Thr Val Ile Asp Ala Leu Asp Gln Gly Ala Ile Glu	
25 30 35 40	
AAA CTG CTT GCT ATG GGA GTG AAG GAG AAG AAT ATC ACT GTA AGC ACC	438
Lys Leu Leu Ala Met Gly Val Lys Glu Lys Asn Ile Thr Val Ser Thr	
45 50 55	
GTT CCA GGT GCG TTT GAA CTA CCA TTT GGC ACT CAG CGG TTT GCC GAG	486
Val Pro Gly Ala Phe Glu Leu Pro Phe Gly Thr Gln Arg Phe Ala Glu	
60 65 70	
CTG ACC AAG GCA AGT GGC AAG CAT TTG GAC GTG GTC ATC CCA ATT GGA	534
Leu Thr Lys Ala Ser Gly Lys His Leu Asp Val Val Ile Pro Ile Gly	
75 80 85	
GTC CTG ATC AAA GGC GAC TCA ATG CAC TTT GAA TAT ATA TCA GAC TCT	582
Val Leu Ile Lys Gly Asp Ser Met His Phe Glu Tyr Ile Ser Asp Ser	
90 95 100	
GTG ACT CAT GCC TTA ATG AAC CTA CAG AAG AAG ATT CGT CTT CCT GTC	630
Val Thr His Ala Leu Met Asn Leu Gln Lys Lys Ile Arg Leu Pro Val	
105 110 115 120	
ATT TTT GGT TTG CTA ACG TGT CTA ACA GAG GAA CAA GCG TTG ACA CGT	678
Ile Phe Gly Leu Leu Thr Cys Leu Thr Glu Glu Gln Ala Leu Thr Arg	
125 130 135	
GCA GGC CTC GGT GAA TCT GAA GGC AAG CAC AAC CAC GGT GAA GAC TGG	726
Ala Gly Leu Gly Glu Ser Glu Gly Lys His Asn His Gly Glu Asp Trp	
140 145 150	
GGT GCT GCT GCC GTG GAG ATG GCT GTA AAG TTT GGC CCA CGC GCC GAA	774
Gly Ala Ala Ala Val Glu Met Ala Val Lys Phe Gly Pro Arg Ala Glu	
155 160 165	
CAA ATG AAG AAG TGAATATTAA AAAATCACTA CTTAAATTA ACGTTTTTAT	826
Gln Met Lys Lys	
170	
TATGTCTATA TCAAATTCTT ACGTGATAAC TTTTGATTTC GCTTCCTGGA TTGGCGCAAG	886
GCCTCCCTGT GTCGAGTTT TTGTTACCGG GTCCACACAG CTCTGTTTTT CCAGAACATA	946
TCCTCCCAGC CGGCGAACCG GTTAGACGCT TCTGCTGGCG TTCTTATTTT	996

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 8:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 172 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8:

Met Ile Lys Gly Leu Gly Glu Val Asp Gln Thr Tyr Asp Ala Ser Ser
 1 5 10 15
 Val Glu Val Gly Ile Val His Ala Arg Trp Asn Lys Thr Val Ile Asp
 20 25 30
 Ala Leu Asp Gln Gly Ala Ile Glu Lys Leu Leu Ala Met Gly Val Lys
 35 40 45
 Glu Lys Asn Ile Thr Val Ser Thr Val Pro Gly Ala Phe Glu Leu Pro
 50 55 60
 Phe Gly Thr Gln Arg Phe Ala Glu Leu Thr Lys Ala Ser Gly Lys His
 65 70 75 80
 Leu Asp Val Val Ile Pro Ile Gly Val Leu Ile Lys Gly Asp Ser Met
 85 90 95
 His Phe Glu Tyr Ile Ser Asp Ser Val Thr His Ala Leu Met Asn Leu
 100 105 110
 Gln Lys Lys Ile Arg Leu Pro Val Ile Phe Gly Leu Leu Thr Cys Leu
 115 120 125
 Thr Glu Glu Gln Ala Leu Thr Arg Ala Gly Leu Gly Glu Ser Glu Gly
 130 135 140
 Lys His Asn His Gly Glu Asp Trp Gly Ala Ala Ala Val Glu Met Ala
 145 150 155 160
 Val Lys Phe Gly Pro Arg Ala Glu Gln Met Lys Lys
 165 170

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 9:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 1511 Basenpaare

(B) ART: Nukleinsäure

(C) STRANGFORM: Doppel

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNS zu mRNS

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iii) ANTISENSE: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Ashbya gossypii

(ix) MERKMALE:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: 5'UTR

(B) LÄNGE: 1..524

(ix) MERKMALE:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS

(B) LÄNGE: 525..1232

(ix) MERKMALE:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: 3'UTR

(B) LAGE: 1233..1511

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 9:

TGTATTCAAC CTGGAGGATA ACGAAATTC CATGGCGCGG GCGATACCAA CCCACAGGAG	60
CCAGATATAA GACCAATCCC GCGGGGTGTG CCAGCCGCCA TCAGAGACAG CGGGCCAGCA	120
AGGCATGTGA AGTCAAAAGG CGCCAGCTCC TTATCCGCTC CCGCACAAGC AGGACCGGCA	180
TATCCCGATG AGCGCGCCAG CACCCAGACG CTACACCACC ATTCTGAAGTA GACTTTAAAA	240
GAGCGCTTTC CAGCTTCTCA GGCAGTTAGC TCTACGACAA AGGAACCAAG TGATTTTCCC	300
GATAGACGCG ACTTGCTCAA CGATGTTTCT GTGACCAGCG CAAGGAGAGA TAGTCCTAAA	360
GTATAATCAG ATAGTTAGTC GTATCTTCTA GTTTTATTAG TCAGCTACAT GCGAACC GC	420
CATTTCTTGA TGCATGTCTT ACGAGTTTAA AAAGCTCGCG GTAGCAGAAA AGAAGATGCA	480
TAGATGGCAT ACCGAAGCCT ATATCGCCCA TAGAAGTTGA TAGG ATG TTT ACC GGT	536
Met Phe Thr Gly	
1	
ATA GTG GAA CAC ATT GGC ACT GTT GCT GAG TAC TTG GAG AAC GAT GCC	584
Ile Val Glu His Ile Gly Thr Val Ala Glu Tyr Leu Glu Asn Asp Ala	
5 10 15 20	
AGC GAG GCA GGC GGC AAC GGT GTG TCA GTC CTT ATC AAG GAT GCG GCT	632
Ser Glu Ala Gly Gly Asn Gly Val Ser Val Leu Ile Lys Asp Ala Ala	
25 30 35	
CCG ATA CTG GCG GAT TGC CAC ATC GGT GAC TCG ATT GCA TGC AAT GGT	680
Pro Ile Leu Ala Asp Cys His Ile Gly Asp Ser Ile Ala Cys Asn Gly	
40 45 50	
ATC TGC CTG ACG GTG ACG GAG TTC ACG GCC GAT AGC TTC AAG GTC GGG	728
Ile Cys Leu Thr Val Thr Glu Phe Thr Ala Asp Ser Phe Lys Val Gly	
55 60 65	
ATC GCA CCA GAA ACA GTT TAT CGG ACG GAA GTC AGC AGC TGG AAA GCT	776
Ile Ala Pro Glu Thr Val Tyr Arg Thr Glu Val Ser Ser Trp Lys Ala	
70 75 80	
GGC TCC AAG ATC AAC CTA GAA AGG GCC ATC TCG GAC GAC AGG CGC TAC	824
Gly Ser Lys Ile Asn Leu Glu Arg Ala Ile Ser Asp Asp Arg Arg Tyr	
85 90 95 100	
GGC GGG CAC TAC GTG CAG GGC CAC GTC GAC TCG GTG GCC TCT ATT GTA	872
Gly Gly His Tyr Val Gln Gly His Val Asp Ser Val Ala Ser Ile Val	
105 110 115	
TCC AGA GAG CAC GAC GGG AAC TCT ATC AAC TTT AAG TTT AAA CTG CGC	920
Ser Arg Glu His Asp Gly Asn Ser Ile Asn Phe Lys Phe Lys Leu Arg	
120 125 130	
GAT CAA GAG TAC GAG AAG TAC GTA GTA GAA AAG GGT TTT GTG GCG ATC	968
Asp Gln Glu Tyr Glu Lys Tyr Val Val Glu Lys Gly Phe Val Ala Ile	
135 140 145	
GAC GGT GTG TCG CTG ACT GTA AGC AAG ATG GAT CCA GAT GGC TGT TTC	1016
Asp Gly Val Ser Leu Thr Val Ser Lys Met Asp Pro Asp Gly Cys Phe	
150 155 160	

TAC ATC TCG ATG ATT GCA CAC ACG CAG ACC GCT GTA GCC CTT CCA CTG	1064
Tyr Ile Ser Met Ile Ala His Thr Gln Thr Ala Val Ala Leu Pro Leu	
165 170 175 180	
AAG CCG GAC GGT GCC CTC GTG AAC ATA GAA ACG GAT GTT AAC GGC AAG	1112
Lys Pro Asp Gly Ala Leu Val Asn Ile Glu Thr Asp Val Asn Gly Lys	
185 190 195	
CTA GTA GAG AAG CAG GTT GCA CAG TAC CTG AAT GCG CAG CTG GAA GGT	1160
Leu Val Glu Lys Gln Val Ala Gln Tyr Leu Asn Ala Gln Leu Glu Gly	
200 205 210	
GAG AGC TCG CCA TTG CAG CGC GTG CTC GAA AGG ATT ATT GAA TCC AAG	1208
Glu Ser Ser Pro Leu Gln Arg Val Leu Glu Arg Ile Ile Glu Ser Lys	
215 220 225	
CTT GCT AGC ATC TCA AAT AAG TGATTATATT ATCTGGGGTG CTGTATATCT	1259
Leu Ala Ser Ile Ser Asn Lys	
230 235	
TATGTATGTC TTACGACTGT GAATCAGAGG GGTGGCAGCT GGAACACCAG CGACACACCT	1319
TCGTCTCCCG CGGTGATCAG CCTTCTGTTT TCCTCAAGTA GTACAAAGTC TAGGACACCC	1379
TGTTGTGGCC AACGCAAACA TGGAGCTGCT GCCCGTTACG CACGTCGAAC TCGTAGACCT	1439
TGCCGTCAAT GCACGAGGCG AACAGGTGGA AACCAGTGGT CTTGTCAAAC CGCCAGCTTC	1499
GTGACCGAGT CC	1511

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 10:

Met	Phe	Thr	Gly	Ile	Val	Glu	His	Ile	Gly	Thr	Val	Ala	Glu	Tyr	Leu
1				5					10					15	
Glu	Asn	Asp	Ala	Ser	Glu	Ala	Gly	Gly	Asn	Gly	Val	Ser	Val	Leu	Ile
			20					25					30		
Lys	Asp	Ala	Ala	Pro	Ile	Leu	Ala	Asp	Cys	His	Ile	Gly	Asp	Ser	Ile
			35					40					45		
Ala	Cys	Asn	Gly	Ile	Cys	Leu	Thr	Val	Thr	Glu	Phe	Thr	Ala	Asp	Ser
			50				55					60			
Phe	Lys	Val	Gly	Ile	Ala	Pro	Glu	Thr	Val	Tyr	Arg	Thr	Glu	Val	Ser
65						70				75					80
Ser	Trp	Lys	Ala	Gly	Ser	Lys	Ile	Asn	Leu	Glu	Arg	Ala	Ile	Ser	Asp
				85					90					95	
Asp	Arg	Arg	Tyr	Gly	Gly	His	Tyr	Val	Gln	Gly	His	Val	Asp	Ser	Val
				100					105				110		
Ala	Ser	Ile	Val	Ser	Arg	Glu	His	Asp	Gly	Asn	Ser	Ile	Asn	Phe	Lys
				115				120					125		
Phe	Lys	Leu	Arg	Asp	Gln	Glu	Tyr	Glu	Lys	Tyr	Val	Val	Glu	Lys	Gly
						130		135				140			
Phe	Val	Ala	Ile	Asp	Gly	Val	Ser	Leu	Thr	Val	Ser	Lys	Met	Asp	Pro
145						150					155				160

29

Asp Gly Cys Phe Tyr Ile Ser Met Ile Ala His Thr Gln Thr Ala Val
 165 170 175
 Ala Leu Pro Leu Lys Pro Asp Gly Ala Leu Val Asn Ile Glu Thr Asp
 180 185 190
 Val Asn Gly Lys Leu Val Glu Lys Gln Val Ala Gln Tyr Leu Asn Ala
 195 200 205
 Gln Leu Glu Gly Glu Ser Ser Pro Leu Gln Arg Val Leu Glu Arg Ile
 210 215 220
 Ile Glu Ser Lys Leu Ala Ser Ile Ser Asn Lys
 225 230 235

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 11:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 1596 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Doppel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNS zu mRNS

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iii) ANTISENSE: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Ashbya gossypii

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: 5'UTR
- (B) LAGE: 1..352

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LAGE: 353..1093

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: 3'UTR
- (B) LAGE: 1094..1596

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 11:

AGAAGAAGCG CAGGCGCCAG TCCGAGCTGG AGGAGAACGA GGCGGCGCGG TTGACGAACA	60
GCGCGCTGCC CATGGACGAT GCGGGTATAC AGACGGCGGG TATACAGACG GCGGGTGTTG	120
CCGAGAGAGG CACCAGGCCG GCTTCCTCCA GCGATGCAAG GAAGAGAAGG GGACCAGAGG	180
CGAAGTTCAA GCCATCTAAG GTACAGAAGC CCAATTGAA GCGAACTGCA TCGTCCCGGG	240
CGGATGAGAA CGAGTTCTCG ATATTATAGA GGCCCCGTT TCGAGTGATT GCGGTCAAAA	300
ACGGCTATCT GCCTTCGTCC GCCCCACCA CCCTCGGGAA CACTGGCAAA CC ATG	355
	Met
	1
GCG CTA ATA CCA CTT TCT CAA GAT CTG GCT GAT ATA CTA GCA CCG TAC	403
Ala Leu Ile Pro Leu Ser Gln Asp Leu Ala Asp Ile Leu Ala Pro Tyr	
5 10 15	
TTA CCG ACA CCA CCG GAC TCA TCC GCA CGC CTG CCG TTT GTC ACG CTG	451
Leu Pro Thr Pro Pro Asp Ser Ser Ala Arg Leu Pro Phe Val Thr Leu	
20 25 30	

30

ACG TAT GCG CAG TCC CTA GAT GCT CGT ATC GCG AAG CAA AAG GGT GAA	499
Thr Tyr Ala Gln Ser Leu Asp Ala Arg Ile Ala Lys Gln Lys Gly Glu	
35 40 45	
AGG ACG GTT ATT TCG CAT GAG GAG ACC AAG ACA ATG ACG CAT TAT CTA	547
Arg Thr Val Ile Ser His Glu Glu Thr Lys Thr Met Thr His Tyr Leu	
50 55 60 65	
CGC TAC CAT CAT AGC GGC ATC CTG ATT GGC TCG GGC ACA GCC CTT GCG	595
Arg Tyr His His Ser Gly Ile Leu Ile Gly Ser Gly Thr Ala Leu Ala	
70 75 80	
GAC GAC CCG GAT CTC AAT TGC CGG TGG ACA CCT GCA GCG GAC GGG GCG	643
Asp Asp Pro Asp Leu Asn Cys Arg Trp Thr Pro Ala Ala Asp Gly Ala	
85 90 95	
GAT TGC ACC GAA CAG TCT TCA CCA CGA CCC ATT ATC TTG GAT GTT CGG	691
Asp Cys Thr Glu Gln Ser Ser Pro Arg Pro Ile Ile Leu Asp Val Arg	
100 105 110	
GGC AGA TGG AGA TAC CGC GGG TCC AAA ATA GAG TAT CTG CAT AAC CTT	739
Gly Arg Trp Arg Tyr Arg Gly Ser Lys Ile Glu Tyr Leu His Asn Leu	
115 120 125	
GGC AAG GGG AAG GCG CCC ATA GTG GTC ACG GGG GGT GAG CCG GAG GTC	787
Gly Lys Gly Lys Ala Pro Ile Val Val Thr Gly Gly Glu Pro Glu Val	
130 135 140 145	
CGC GAA CTA GGC GTC AGT TAC CTG CAG CTG GGT GTC GAC GAG GGT GGC	835
Arg Glu Leu Gly Val Ser Tyr Leu Gln Leu Gly Val Asp Glu Gly Gly	
150 155 160	
CGC TTG AAT TGG GGC GAG TTG TTT GAG CGA CTC TAT TCT GAG CAC CAC	883
Arg Leu Asn Trp Gly Glu Leu Phe Glu Arg Leu Tyr Ser Glu His His	
165 170 175	
CTG GAA AGT GTC ATG GTC GAA GGC GGC GCG GAG GTG CTC AAC CAG CTG	931
Leu Glu Ser Val Met Val Glu Gly Gly Ala Glu Val Leu Asn Gln Leu	
180 185 190	
CTG CTG CGC CCA GAT ATT GTG GAC AGT CTG GTG ATC ACG ATA GGA TCC	979
Leu Leu Arg Pro Asp Ile Val Asp Ser Leu Val Ile Thr Ile Gly Ser	
195 200 205	
AAG TTC CTG GGC TCA CTA GGT GTT GCG GTC TCA CCA GCT GAG GAG GTG	1027
Lys Phe Leu Gly Ser Leu Gly Val Ala Val Ser Pro Ala Glu Glu Val	
210 215 220 225	
AAC CTA GAG CAT GTG AAC TGG TGG CAC GGA ACA AGT GAC AGT GTT TTG	1075
Asn Leu Glu His Val Asn Trp Trp His Gly Thr Ser Asp Ser Val Leu	
230 235 240	
TGC GGC CGG CTC GCA TAGCGGTTAT GACTGGTCTA CTAGTTAAAA CTATTTACTC	1130
Cys Gly Arg Leu Ala	
245	
CTATACATAT TGCGTCACAT AGCGTTTATC CCCCTCGCCA ACCGCCTCGT GCCGTTGGAA	1190
ACACGGCGGC CGGGGGACCT CAAGCGCTCC GCATCGACTA GTTTAATTTA CAAACAGATT	1250
CTGTAACCTTG CGTAACGGCC AGAGGTCTCT GACTTTCTGA TAATCTTCAC CACCTCACCT	1310
CGCTTCAACC CCAGGTATAA TGCAACTTGG ATCCATCCTC TGGATTCTAG GTAACCTGAGA	1370
TTCTTTTAAC CTGTATCTCT TCAACAACTC CTTCTTTTCT TCGTCGCTGA GTTTGATATG	1430

TTTTGGCACA AGCTCATGGT GCGTGATATT TACCACCAAA GCTGTTTCGT TGAAAGTCTC 1490
 AATTGTAGCA GGAGCGACGG AGGGAAGCAG TTTCAACGCG CTGGGCGTTA TGCCGTTCTG 1550
 ATATATGAAA ATACCCGTCT GGAAGTTCTT CTCGCCAATG TGGATC 1596

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 12:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 246 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 12:

Met Ala Leu Ile Pro Leu Ser Gln Asp Leu Ala Asp Ile Leu Ala Pro
 1 5 10 15
 Tyr Leu Pro Thr Pro Pro Asp Ser Ser Ala Arg Leu Pro Phe Val Thr
 20 25 30
 Leu Thr Tyr Ala Gln Ser Leu Asp Ala Arg Ile Ala Lys Gln Lys Gly
 35 40 45
 Glu Arg Thr Val Ile Ser His Glu Glu Thr Lys Thr Met Thr His Tyr
 50 55 60
 Leu Arg Tyr His His Ser Gly Ile Leu Ile Gly Ser Gly Thr Ala Leu
 65 70 75 80
 Ala Asp Asp Pro Asp Leu Asn Cys Arg Trp Thr Pro Ala Ala Asp Gly
 85 90 95
 Ala Asp Cys Thr Glu Gln Ser Ser Pro Arg Pro Ile Ile Leu Asp Val
 100 105 110
 Arg Gly Arg Trp Arg Tyr Arg Gly Ser Lys Ile Glu Tyr Leu His Asn
 115 120 125
 Leu Gly Lys Gly Lys Ala Pro Ile Val Val Thr Gly Gly Glu Pro Glu
 130 135 140
 Val Arg Glu Leu Gly Val Ser Tyr Leu Gln Leu Gly Val Asp Glu Gly
 145 150 155 160
 Gly Arg Leu Asn Trp Gly Glu Leu Phe Glu Arg Leu Tyr Ser Glu His
 165 170 175
 His Leu Glu Ser Val Met Val Glu Gly Gly Ala Glu Val Leu Asn Gln
 180 185 190
 Leu Leu Leu Arg Pro Asp Ile Val Asp Ser Leu Val Ile Thr Ile Gly
 195 200 205
 Ser Lys Phe Leu Gly Ser Leu Gly Val Ala Val Ser Pro Ala Glu Glu
 210 215 220
 Val Asn Leu Glu His Val Asn Trp Trp His Gly Thr Ser Asp Ser Val
 225 230 235 240
 Leu Cys Gly Arg Leu Ala
 245

Patentansprüche

1. DNA-Sequenzen, die für ein Polypeptid mit der in SEQ ID NO: 2
5 dargestellten Aminosäuresequenz codieren oder für ein Analoges oder Derivat des Polypeptids gemäß SEQ ID NO: 2, worin eine oder mehrere Aminosäuren deletiert, hinzugefügt oder durch andere Aminosäuren substituiert worden sind, ohne die enzymatische Wirkung des Polypeptids wesentlich zu reduzieren.
10
2. DNA-Sequenzen, die für ein Polypeptid mit der in SEQ ID NO: 4
dargestellten Aminosäuresequenz codieren oder für ein Analoges oder Derivat des Polypeptids gemäß SEQ ID NO: 4, worin
15 eine oder mehrere Aminosäuren deletiert, hinzugefügt oder durch andere Aminosäuren substituiert worden sind, ohne die enzymatische Wirkung des Polypeptids wesentlich zu reduzieren.
- 20 3. DNA-Sequenzen, die für ein Polypeptid mit der in SEQ ID NO: 6
dargestellten Aminosäuresequenz codieren oder für ein Analoges oder Derivat des Polypeptids gemäß SEQ ID NO: 6, worin eine oder mehrere Aminosäuren deletiert, hinzugefügt oder durch andere Aminosäuren substituiert worden sind, ohne die
25 enzymatische Wirkung des Polypeptids wesentlich zu reduzieren.
4. DNA-Sequenzen, die für ein Polypeptid mit der in SEQ ID NO: 8
dargestellten Aminosäuresequenz codieren oder für ein Analoges oder Derivat des Polypeptids gemäß SEQ ID NO: 8, worin
30 eine oder mehrere Aminosäuren deletiert, hinzugefügt oder durch andere Aminosäuren substituiert worden sind, ohne die enzymatische Wirkung des Polypeptids wesentlich zu reduzieren.
- 35 5. DNA-Sequenzen, die für ein Polypeptid mit der in SEQ ID NO: 10
dargestellten Aminosäuresequenz codieren oder für ein Analoges oder Derivat des Polypeptids gemäß SEQ ID NO: 10, worin eine oder mehrere Aminosäuren deletiert, hinzugefügt oder
40 durch andere Aminosäuren substituiert worden sind, ohne die enzymatische Wirkung des Polypeptids wesentlich zu reduzieren.

6. DNA-Sequenzen, die für ein Polypeptid mit der in SEQ ID NO: 12 dargestellten Aminosäuresequenz codieren oder für ein Analoges oder Derivat des Polypeptids gemäß SEQ ID NO: 12, worin eine oder mehrere Aminosäuren deletiert, hinzugefügt oder durch andere Aminosäuren substituiert worden sind, ohne die enzymatische Wirkung des Polypeptids wesentlich zu reduzieren.
7. Expressionsvektor, enthaltend eine oder mehrere DNA-Sequenzen gemäß Anspruch 1 bis 6.
8. Wirtsorganismus der mit einem Expressionssystem gemäß Anspruch 7 transformiert worden ist.
9. Rekombinantes Herstellverfahren für Riboflavin, dadurch gekennzeichnet, daß ein Wirtsorganismus gemäß Anspruch 8 verwendet wird.

20

25

30

35

40

45

1/7

Fig. 1

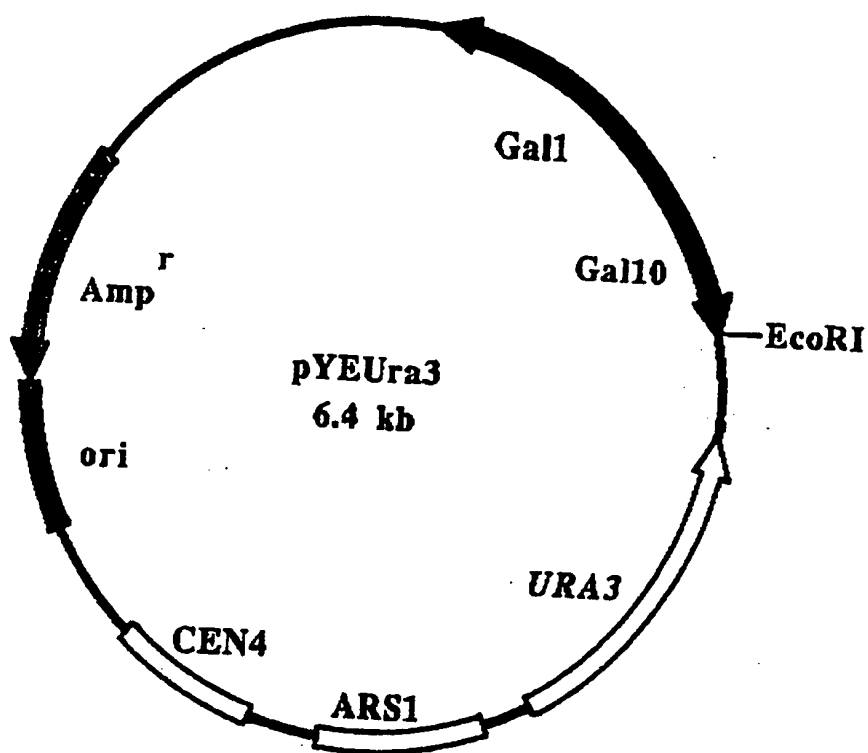


Fig. 2

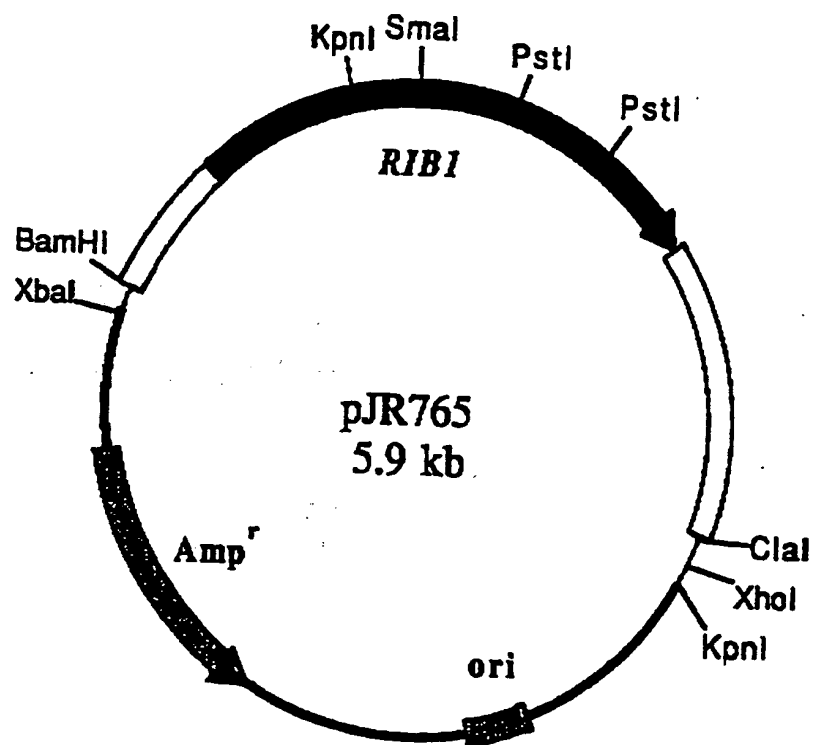


Fig. 3

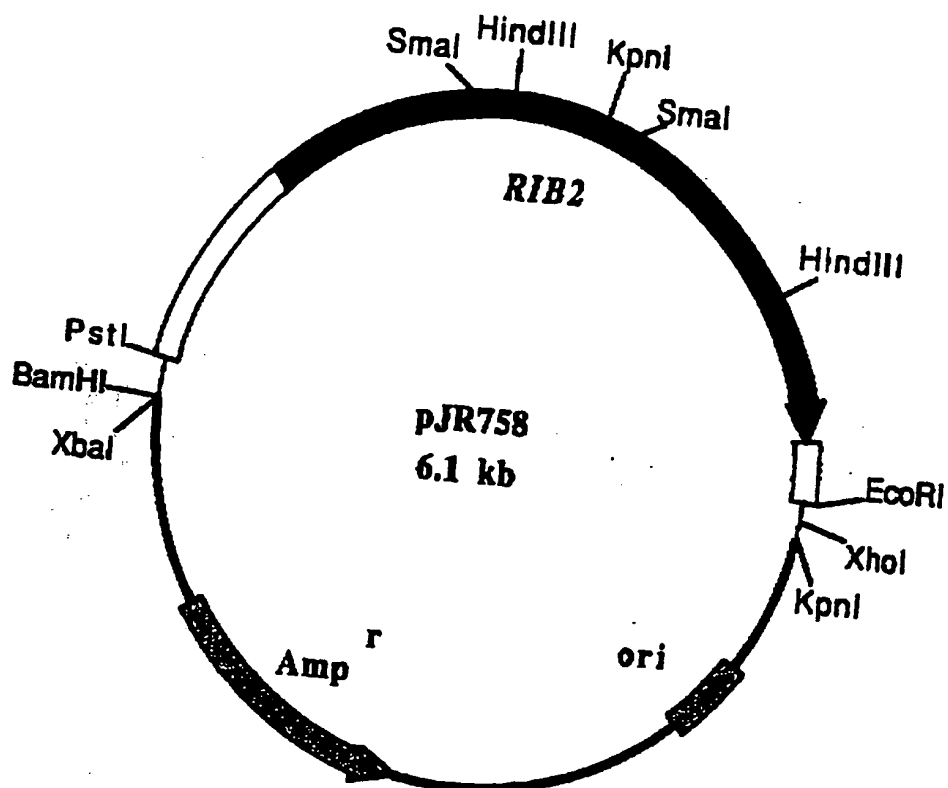


Fig. 4

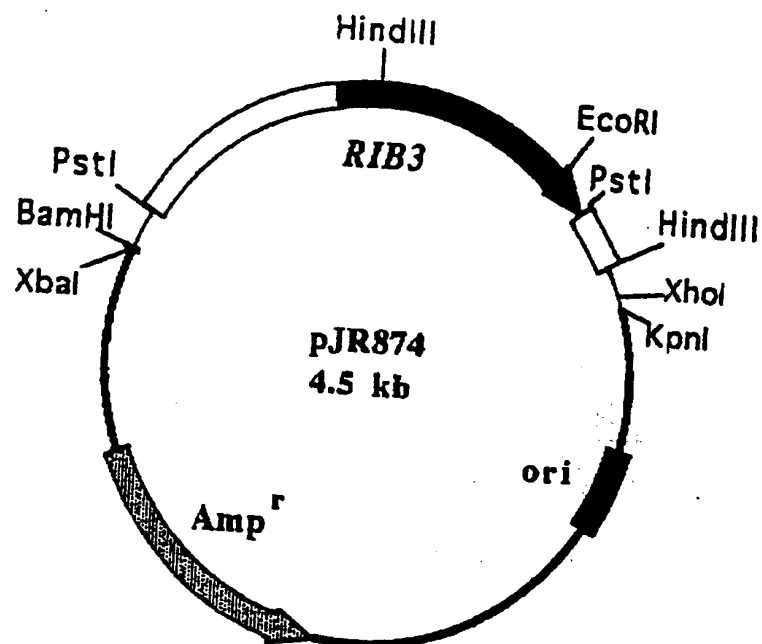


Fig. 5

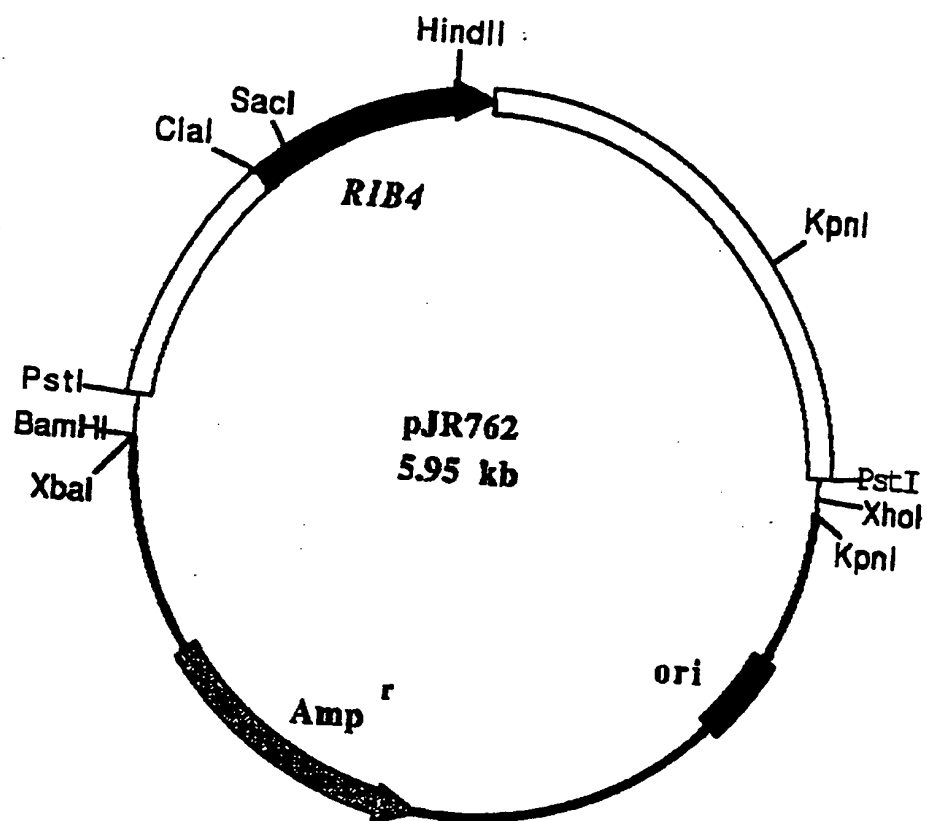


Fig. 6

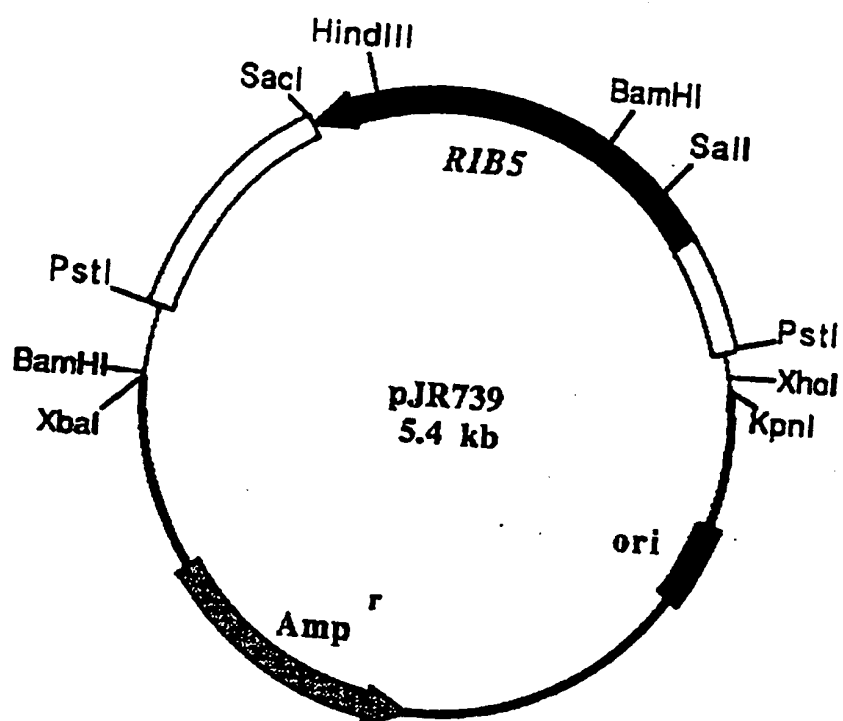
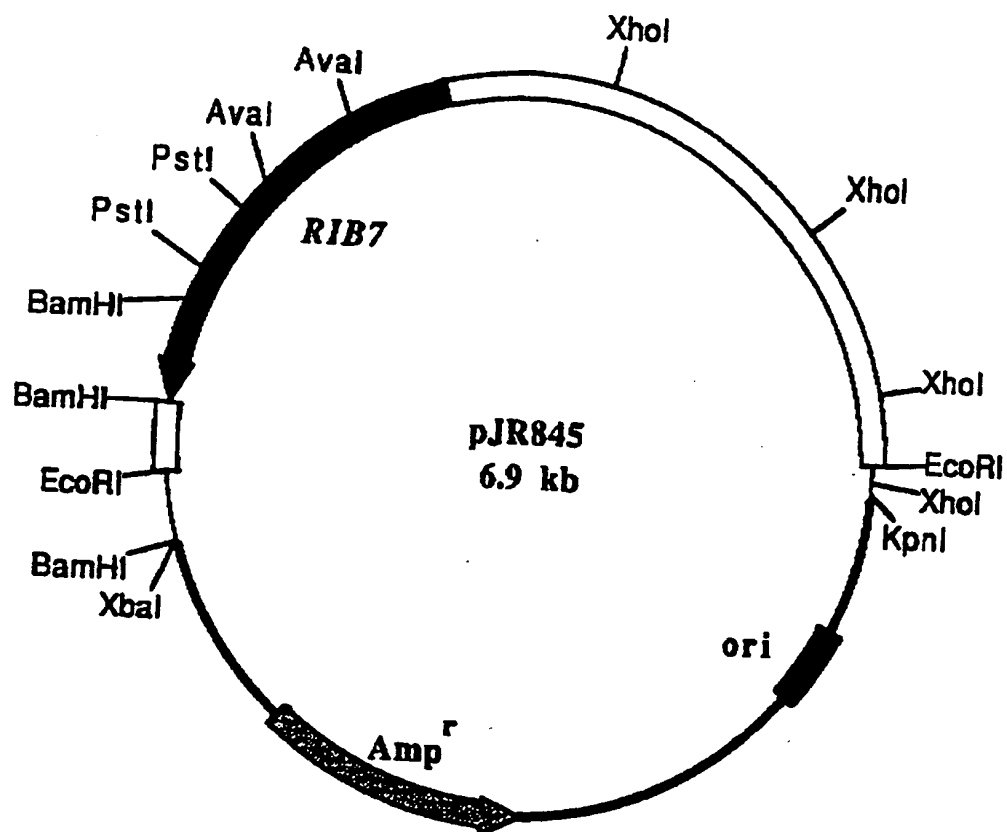


Fig. 7



A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N15/52 C12N15/53 C12N15/54 C12N15/55 C12N15/81
 C12N1/19 C12P25/00 //(C12N1/19,C12R1:865)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N C12P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	YEAST, vol. 9, no. 10, October 1993 JOHN WILEY & SONS LTD., CHICHESTER, UK, pages 1099-1102, M.-J. BUITRAGO ET AL. 'Mapping of the RIB1 and RIB7 genes involved in the biosynthesis of riboflavin in Saccharomyces cerevisiae' see the whole document ---	1,6-9
X	YEAST (1993), 9(2), 189-99 CODEN: YESTE3;ISSN: 0749-503X, 1993 DOIGNON, FRANCOIS ET AL 'The complete sequence of a 19,482 bp segment located on the right arm of chromosome II from Saccharomyces cerevisiae' see the whole document ---	5,7-9
-/--		

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier document but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

29 June 1995

Date of mailing of the international search report

29.08.95

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Hillenbrand, G

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internation. Application No

PCT/EP 95/00958

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP,A,0 405 370 (F. HOFFMANN-LA ROCHE AG) 2 January 1991 cited in the application see the whole document ---	1-9
X	EP,A,0 569 806 (BASF) 18 November 1993 see the whole document ---	5,7-9
P,X	WO,A,94 11515 (BASF) 26 May 1994 see the whole document -----	1-9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP 95/00958

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A-0405370	02-01-91	CN-A- 1049185 JP-A- 3117489	13-02-91 20-05-91
EP-A-0569806	18-11-93	JP-A- 6022765	01-02-94
WO-A-9411515	26-05-94	DE-A- 4238904	26-05-94

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

International: Aktenzeichen

PCT/EP 95/00958

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 C12N15/52 C12N15/53 C12N15/54 C12N15/55 C12N15/81
C12N1/19 C12P25/00 //(C12N1/19,C12R1:865)

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C12N C12P

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	YEAST, Bd. 9, Nr. 10, Oktober 1993 JOHN WILEY & SONS LTD., CHICHESTER, UK, Seiten 1099-1102, M.-J. BUITRAGO ET AL. 'Mapping of the RIB1 and RIB7 genes involved in the biosynthesis of riboflavin in Saccharomyces cerevisiae' insgesamt ---	1,6-9
X	YEAST (1993), 9(2), 189-99 CODEN: YESTE3;ISSN: 0749-503X, 1993 DOIGNON, FRANCOIS ET AL 'The complete sequence of a 19,482 bp segment located on the right arm of chromosome II from Saccharomyces cerevisiae' insgesamt --- -/-	5,7-9



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

3

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absenddatum des internationalen Recherchenberichts
29. Juni 1995	29.08.95
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Bevollmächtigter Bediensteter Hillenbrand, G

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	EP,A,0 405 370 (F. HOFFMANN-LA ROCHE AG) 2.Januar 1991 in der Anmeldung erwähnt insgesamt ---	1-9
X	EP,A,0 569 806 (BASF) 18.November 1993 insgesamt ---	5,7-9
P,X	WO,A,94 11515 (BASF) 26.Mai 1994 insgesamt -----	1-9

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internation Aktenzeichen

PCT/EP 95/00958

Im Recherchenbericht angeführtes Patentedokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
EP-A-0405370	02-01-91	CN-A-	1049185	13-02-91
		JP-A-	3117489	20-05-91
EP-A-0569806	18-11-93	JP-A-	6022765	01-02-94
WO-A-9411515	26-05-94	DE-A-	4238904	26-05-94